



The Journal of Biochemistry, Vol. 2, No. 1.

CHEMIE DER SCHLANGEN.

Über die Fettstoffe der Schlangen.

VON

HIROYUKI IMAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.

Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 25. September 1939).

Da die chemischen Stoffe, aus welchen sich die Zelle zusammensetzt, einerseits die Grundlage der in der Zelle verlaufenden chemischen Vorgänge bilden und andererseits die Organisationsanlage bei den verschiedenen tierischen Körpern begründen, so verlohnt es sich der Mühe, die chemische Zusammensetzung der einzelnen Organe bei den verschiedenen Tierarten vergleichend zu untersuchen.

Bei einer kritischen Betrachtung der Analysenergebnisse sämtlicher bisher untersuchter Tierfette zeigte sich, dass bis auf wenige Ausnahmen, die ihre Erklärung in Anpassungserscheinungen der betreffenden Tierfamilien an die Bedingungen ihrer Umwelt finden, zwei andere Gruppen von Wirbeltieren über Körper- und Organfette verfügen, die innerhalb dieser Gruppen weitgehende Analogien, hauptsächlich bezüglich ihres Sättigungsgrades bzw. des Gehaltes an hoch-ungesättigten Säuren aufweisen.

Was die Fette der Schlangen anbetrifft, deren Kenntnis man vorwiegend japanischen Autoren verdankt, so ist eine Untersuchung hauptsächlich nach physikalischen und chemischen Kennzahlen ausgeführt.

Zum Vergleich sind in Tabelle I die gleichnamigen Ziffern für Schlangenfette angeführt. Dieselben sind der Zusammenstellung von Grün und Halden (1929) entnommen.

Von dem Fett aus dem Schlangenhemd des Python wurden durch Untersuchung von Oikawa (1925) die folgenden Kennzahlen ermittelt: Verseifungszahl=104,9; Jodzahl=20,0; Acetylzahl=19,3.

TABELLE I.

Schlangen- arten	Ver- breitung	Material	Schmp.	Dichte	Verseif. Zahl	Jodzahl
Python reticulat.	Ostasien	Öl		0,9165	194,1	80,3
Boa constrict.	Zentral u. Süd- Amerika	Fett	28,5°	0,8629	196,8	79,4
Elaphe elimacoph.	Japan	Fett	37,0°	0,9139	194,5	86,
Natrix tigrina	Japan	Öl		0,9194	195,8	102,8
Crotalus durissus	Amerika	Fett		0,9217	210,9	105,6
Agkistrodon Blomhoffii	Japan	Öl		0,9192	187,7	110,8

Die untersuchte Probe zeigte die Säurezahl 19,3 und enthielt 24,9% unverseifbare Substanz (3,1% Cholesterin).

Die Schlange bereitet also zwei Gruppen von Fettsubstanz, die ihrer Funktion nach verschieden gebaut sind. Das Fett des Schlangenhelmes gehört zur Kategorie der Fette des Epithelialgebildes, während das Fett aus Fettgeweben den Charakter zeigt, der im allgemeinen dem Körperfett von Säugetieren zukommt.

Da ich ein zur Untersuchung ausreichendes Quantum des Materials bekommen konnte, so habe ich dieses zu meinen Studien verwendet. Von den Fetten der *Naja naja atra*, des *Bungarus multicinctus* und der *Elaphe carinata* wurden zunächst die Kennzahlen bestimmt und dann die einzelnen Bestandteile isoliert.

VERSUCHSTEIL.

A. Die Kennzahlen der Körperfette verschiedener Schlangenarten.

Da die Kennzahlen das Mass sind für eine bestimmte Atomgruppe, eine bestimmte Verbindung, oder eine bestimmte Gruppe von Verbindungen, so sind sie oft für bestimmte Klassen von Fetten und Wachsen charakteristisch. Um die Kennzahlen der Körperfette der Schlangen zu bestimmen, habe ich als Unter-

suchungsmaterial vier verschiedene Schlangenarten verwendet, nämlich *Naja naja atra*, *Bungarus multicinctus*, *Trimeresurus mucrosquamatus* und *Elaphe carinata*. Nach dem Entfernen der Haut und Eingeweide wurden die Rumpfteile mit Alkohol und Äther behandelt. Der Alkohol-Äther-Extrakt wurde eingedampft und wieder mit denselben Solventien behandelt. Der von Salzen befreite Extrakt wurde im Exsiccator bis zur Gewichtskonstante getrocknet. Einzelne Kennzahlen wurden in der bekannter Weise bestimmt.

Die Resultate sind in Tabelle II verzeichnet.

TABELLE II.

Arten der Schlangen	Säurezahl	Verseifungszahl	Reichert u. Meisslsche Zahl	Jodzahl
<i>Naja naja atra</i>	50,42	181,85	2,59	76,46
<i>Bungarus multicinctus</i>	58,67	175,00	1,39	82,62
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	57,18	172,23	5,90	88,65
<i>Elaphe carinata</i> (Rumpfteil)	56,82	191,74	4,10	80,46
<i>Elaphe carinata</i> (Fett in Bauchhöhle)	3,52	173,42	0,40	75,69

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, zeigte sich bei verschiedenen Schlangenarten kein auffallender Unterschied in den Kennzahlen der Fette.

B. Isolierung der einzelnen Bestandteile der Fettstoffe.

Nach dem Entfernen der Haut und Eingeweide wurden die Rumpfteile der Schlangen mit Alkohol und Äther extrahiert. Der Alkohol-Ätherextrakt wurde durch wiederholte Extraktion tunlichst von Wasser befreit, im Vakuum eingedampft, schliesslich in absoluten Alkohol heiss aufgenommen. Eine P-haltige, N-freie und bei 175° schmelzende Substanz scheidet sich aus diesem Alkoholextrakt. Das Cholesterin wird auch aus dieser Fraktion krystallin isoliert. Die alkoholische Mutterlauge wurde einge-

dampft und in trocknen Äther aufgenommen und dann mit Aceton gefällt. In Aceton unlöslich, wurden dabei die Phosphatide gewonnen. Die Neutralfette und freie Fettsäuren, welche in Aceton löslich sind, werden nach dem Neutralisieren durch Ätherextraktion getrennt. Man hat die Neutralfette mit Kalilauge hydrolysiert und die Komponente analysiert. Durch Twitschellsche Bleisalzmethodode wurden die festen und flüssigen Fettsäuren isoliert.

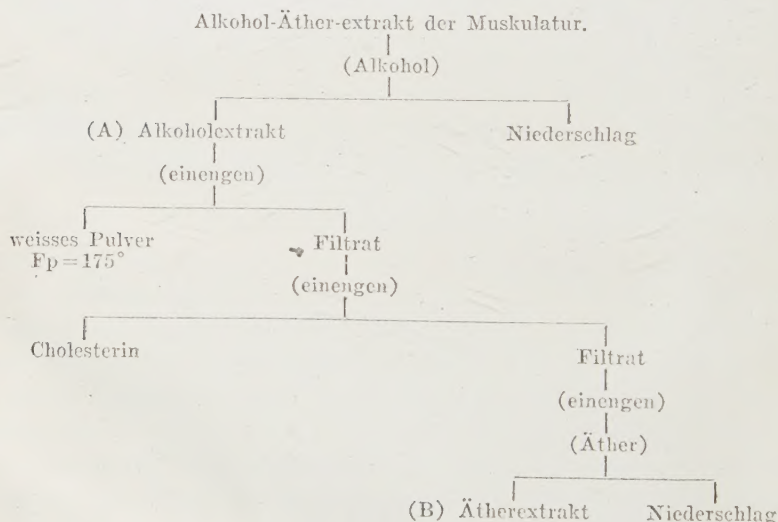
Die Isolierung der einzelnen Bestandteile der Fettstoffe wurde also in den folgend schematisch dargestellten Ordnungen bearbeitet.

Als Untersuchungsmaterial habe ich die Muskulatur von *Naja naja atra*, *Bungarus multicinctus* und *Elaphe carinata* verwendet und besonders auf Neutralfette, freie Fettsäuren, Cholesterin und Phosphatide verarbeitet.

Da es mir nun hauptsächlich auf eine Untersuchung der krystallinen Substanzen ankam, so begnügte ich mich mit diesen quantitativen Ergebnissen.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle IV verzeichnet.

TABELLE III.



(Fortsetzung der Tabelle III)

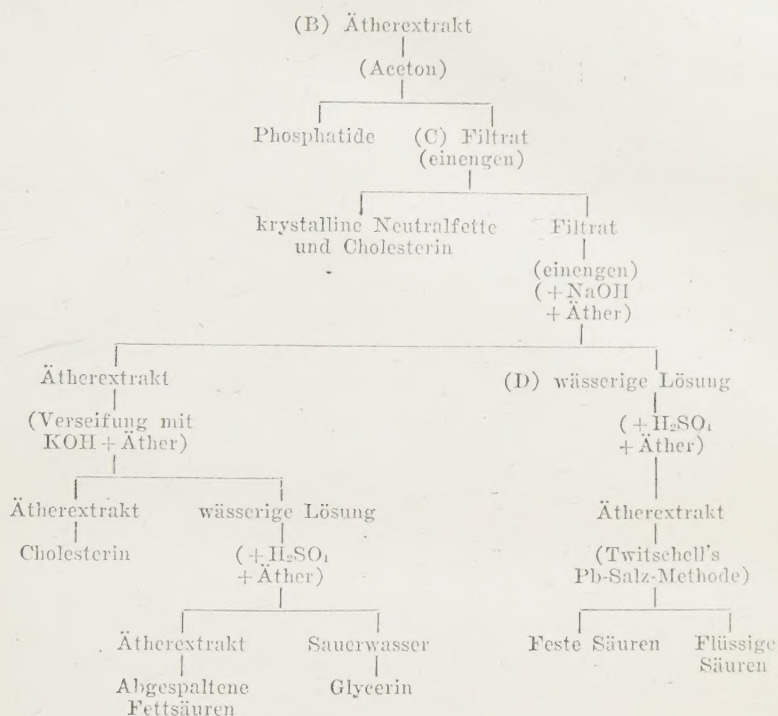


TABELLE IV.

Gehalt der Muskulatur	Muskulatur von		
	Naja naja atra 19,33 kg	Bungarus multicinctus 21,30 kg	Elaphe carinata 23,45 kg
Gesamt-Fettstoffe	305 g	-237 g	194 g
1. Weisses Pulver (P-haltig, Fp=175°)	5,0 g	2,0 g	0
2. Cholesterin	15,3 g	13,5 g	1,4 g
3. Phosphatide	3,7 g	18,0 g	20,0 g
4. Neutralfette (Rohprodukte)	48,0 g	18,7 g	80,0 g
5. Freie Fettsäuren (Rohprodukte)	4,0 g	3,2 g	2,8 g

1. *Darstellung des weissen Pulvers, welches bei 175° schmilzt.*

A-Fraktion muss freie Fettsäuren, Neutralfette, Phosphatide und Sterine enthalten. Wenn man diese Fraktion wiederholt mit Alkohol behandelt und den Alkoholextrakt einengt, so scheidet sich zunächst ein weisses Pulver aus. Diese Substanz ist in den Muskeln von den untersuchten Giftschlangen vorhanden, während sie in dem Muskel von *Elaphe carinata* fehlt. Sie ist in Äther, Aceton und in kaltem Alkohol unlöslich. In heissem Alkohol löst sie sich leicht. In Chloroform ist sie leicht löslich. Die Lösung reagiert gegen Lackmus neutral. Die Farbenreaktionen von Cholesterin und Gallensäuren sind negativ. Sie gibt kein Reduktionsvermögen. Sie addiert kein Brom. Sie hat keinen Stickstoff, wohl aber 2 proz. Phosphor. Sie zeigte folgende Analysendaten:

2,910 mg Subst. (aus Kobramuskeln)	7,130 mg CO ₂ ,	2,850 mg H ₂ O
3,370 mg " " "	8,220 mg " "	3,320 mg " "
5,085 mg Subst. (aus Muskeln von <i>Bungarus multicinctus</i>)		
	12,345 mg CO ₂ ,	5,050 mg H ₂ O
5,350 mg " " "	12,960 mg " "	5,300 mg " "
C 66,82 66,52 66,21 66,07 H 10,96 11,02 11,11 11,08		

Durch Erhitzen mit Salzsäure erfährt die Verbindung keine Veränderung. Mit 50 proz. alkoholischer Natronlauge wird sie nicht verseift.

2. *Darstellung des Cholesterins.* Wenn man das weisse Pulver aus der A-Fraktion getrennt hatte, so schied sich das Cholesterin teilweise krystallinisch aus. Das Filtrat des krystallinen Cholesterins wurde eingedampft und mit Äther extrahiert. Der Ätherrückstand wurde zur Trennung der Phosphatide mit Aceton gefällt. Das Filtrat der Acetonfällung wurde eingengt. Dabei schieden sich krystallines Neutralfett und Cholesterin aus. Wird die Mutterlauge abgedampft, mit Wasser aufgenommen und nach Zusatz von Natronlauge mit Äther behandelt, so werden die Reste des Cholesterins und der Neutralfette in Äther übergehen. Wenn man den Extrakt mit Kalilauge verseift und dann mit Äther extrahiert, so erhält man das Cholesterin als Ätherextrakt. In wässrige Lösung gehen das Glycerin und Seife. Die nach dem Verdunsten des Äthers zurückbleibende Masse wurde im Eisschrank

stehen gelassen. Es schied sich Cholesterin krystallinisch aus, welches bei 145° schmilzt.

3,470 mg Subst.	10,640 mg CO_2 ,	3,710 mg H_2O
3,615 mg "	11,070 mg "	3,895 mg "
Ber. für $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$	C 83,85	H 12,00
Gefunden	83,63	11,96
	83,53	12,05

Die acetylierte Verbindung schmilzt bei 114° , bei der Mischprobe mit Acetylcholesterin zeigt sie keine Schmelzpunktdepression.

3. *Bearbeitung der Phosphatidfraktion.* Die in Äther lösliche B-Fraktion wurde abgedampft und der Rückstand dann mit heissem Aceton behandelt. Die in Aceton unlöslichen Teile wurden auf Phosphatid untersucht. Aus der Fällung wurde das Phosphatid mit absolutem Alkohol extrahiert und als CdCl_2 -Verbindung niedergeschlagen. Mit der regenerierten Lösung wurden P und N bestimmt.

Substanz aus Kobramuskeln:

0,1788 g Substanz, nach Kjeldahl auf N untersucht, verbrauchten		
7,9 ccm $n/20\text{-H}_2\text{SO}_4$.		
0,1842 g "	"	"
8,2 ccm $n/20\text{-H}_2\text{SO}_4$.		
0,2200 g Substanz, nach Neumann auf P untersucht, verbrauchten		
13,2 ccm $n/2\text{-NaOH}$.		
0,1058 g "	"	"
6,4 ccm $n/2\text{-NaOH}$.		
P	3,30	3,35
N	3,09	3,11

Substanz aus Muskeln von *Bungarus multicinctus*:

0,3107 g Substanz, nach Kjeldahl, verbrauchten	15,1 ccm $n/20\text{-H}_2\text{SO}_4$.
0,2190 g " " "	11,9 ccm "
0,3815 g Substanz, nach Neumann, verbrauchten	21,85 ccm $n/2\text{-NaOH}$.
0,3744 g " " "	21,65 ccm "
P	3,14 3,20
N	3,40 3,38

Substanz aus Muskeln von *Elaphe carinata*:

0,4517 g Substanz, nach Kjeldahl, verbrauchten	9,3 ccm $n/10\text{-H}_2\text{SO}_4$.
0,4524 g " " "	9,45 ccm "

0,6848 g	Substanz, nach Neumann, verbrauchten	37,4 ccm	n/2-NaOH,
0,5370 g	" " "	"	38,3 ccm "
	P	3,02	2,92
	N	2,79	2,83

Das Verhältnis P:N beträgt also 1:2. Hieraus geht hervor, dass die Schlangengmuskeln wahrscheinlich kein Lecithin besitzen. Vielmehr kann man aus den Analysen vermuten, dass hier ein Diamino-mono-phosphatid vorliegt.

Um gewisse Anhaltspunkte über die Konstitution dieser Verbindung zu erhalten, habe ich den Spaltungsversuch angestellt. Jedes Phosphatid aus drei verschiedenen Schlangenarten wurde mit 10 proz. alkoholischer Salzsäurelösung 20 Stunden lang gekocht. Das Hydrolysat wurde nach dem Einengen mit Äther extrahiert. Aus dem Ätherextrakt konnte ich nach dem Twitschellschen Verfahren die Palmitinsäure als Bleisalz isolieren. In der wässrigen Lösung waren das Glycerin und Cholin nachweisbar. Palmitinsaures Blei wurde entbleit und die freie Säure analysiert.

3,430 mg	Substanz,	9,440 mg	CO ₂ ,	3,730 mg	H ₂ O.
3,635 mg	"	10,010 mg	"	4,060 mg	"
3,920 mg	"	10,815 mg	"	4,370 mg	"
Ber. für C ₁₆ H ₃₂ O ₂ (Palmitinsäure):					
			C	75,00	H 12,50
			Gefunden:	75,06	12,17
				75,10	12,50
				75,24	12,47

4. *Untersuchung auf Neutralfette.* C-Fraktion muss freie Fettsäuren, Fette und Cholesterin enthalten. Wenn ein leicht krystallisierbares Neutralfett reichlich vorhanden ist, so kann man es durch Einengen der C-Fraktion erhalten. Das Cholesterin kann auch daraus isoliert werden. Wenn man die Mutterlauge mit Natronlauge versetzt und dann mit Äther extrahiert, so gehen Fette und Cholesterin in Äther über und die Natronseife bleiben in wässriger Lösung zurück. Der Ätherextrakt wird abgedampft, mit Kalilauge verseift und wieder mit Äther extrahiert. Dabei wird das Cholesterin in Äther aufgenommen. Werden die Kali-seifen mit H₂SO₄ angesäuert und mit Äther extrahiert, so werden die Fettsäuren den Äther und das Glycerin die wässrige Lösung aufsuchen.

Die abgespaltenen Fettsäuren wurden zuerst nach dem Bleisalz-Verfahren von Twitschell in krystalline und lösliche Bleisalze geteilt. Die krystallinen Bleisalze wurden nach dem Entbleien durch fraktionierte Krystallisation in Palmitin- und Stearinsäure getrennt. Die löslichen Bleisalze wurden entweder als Methylester oder Lithiumsalze fraktioniert und eventuell als freie Säuren krystallin isoliert.

Die Mengenverhältnisse der krystallinisch erhaltenen Verbindungen sind kurz in Tabelle V zusammengestellt.

TABELLE V.

Muskulatur von	Gehalt der Muskulatur					
	Rohe Neutral- Fette	Reines Tri- palmitin	Abgespaltene Fettsäuren			
			Palmitin- säure	Stearin- säure	Oleinsäure als	
					Li-Salz	Dioxy- stearinsäure.
<i>Naja naja atra</i> (19,33 kg)	48,0 g	—	1,85 g	2,07 g	1,21 g	—
<i>Bungarus multicinctus</i> (21,30 kg)	18,7 g	—	0,45 g	2,12 g	19,10 g	—
<i>Elaphe carinata</i> (23,45 kg)	80,0 g	3,50 g	13,60 g	0	23,80 g	1,20 g

Analyse:

1) Tripalmitin aus Muskeln von *Elaphe carinata*—

3,675 mg Subst. 10,190 mg CO₂, 3,950 mg H₂O.

4,395 mg „ 12,190 mg „ 4,705 mg „

Ber. für C₅₁H₉₅O₆ C 75,93 H 12,15

Gefunden 75,62 12,02

75,64 11,98

Nach dem Verseifen wird Palmitinsäure abgespalten.

4,580 mg Subst. 12,550 mg CO₂, 5,075 mg H₂O.

3,610 mg „ 9,925 mg „ 3,930 mg „

Ber. für C₁₉H₃₇O₂ C 75,00 H 12,50

Gefunden 74,73 12,40

74,98 12,18

2) Palmitinsäure—

a) aus Muskeln von *Naja naja atra*:

3,325 mg Subst.	9,140 mg CO ₂ ,	3,765 mg H ₂ O.
3,469 mg "	9,570 mg "	3,850 mg "

b) aus Muskeln von *Bungarus multicinctus*:

3,640 mg "	10,050 mg "	4,100 mg "
3,270 mg "	9,030 mg "	3,680 mg "

c) aus Muskeln von *Eklaphe carinata*:

3,185 mg "	8,770 mg "	3,550 mg "
3,225 mg "	8,900 mg "	3,580 mg "

Berechnet für

Gefunden

C ₁₆ H ₃₂ O ₂	a	b	c
C 75,00	74,97	75,30	75,10
	75,24	75,31	75,26
H 12,50	12,67	12,60	12,47
	12,42	12,59	12,42

3) Stearinsäure—

a) aus Muskeln von *Naja naja atra*:

3,440 mg Subst.	9,535 mg CO ₂ ,	3,870 mg H ₂ O.
3,415 mg "	9,475 mg "	3,825 mg "

b) aus Muskeln von *Bungarus multicinctus*:

4,250 mg Subst.	11,825 mg CO ₂ ,	4,830 mg H ₂ O.
4,000 mg "	11,110 mg "	4,510 mg "
3,630 mg "	10,090 mg "	4,030 mg "

Berechnet für

Gefunden

C ₁₈ H ₃₆ O ₂	a	b	
C 75,98	75,60	75,88	
	75,67	75,75	75,81
H 12,76	12,59	12,72	
	12,53	12,61	
		12,42	

4) Oleinsäure—

Oleinsäure wurde durch die Jodzahl identifiziert. Die Analysenzahlen stimmten mit der Jodzahl der Oleinsäure (=89,4) gut überein. Man bekam weiter Dioxystearinsäure, wenn man die Oleinsäure mit Kaliumpermanganat oxydierte.

3,330 mg Subst.	8,365 mg CO ₂ ,	3,240 mg H ₂ O.
3,070 mg "	8,670 mg "	3,020 mg "

Berechnet für C₁₈H₃₀O₄

C 68,29 H 11,47

Gefunden 68,51 10,89

68,14 11,01

Überblickt man die Resultate der Untersuchungen von Neutralfetten, so ergibt sich als auffallendstes Ergebnis ein grosser Gehalt der Muskeln von *Elaphe carinata* an Palmitinsäure und Oleinsäure. Aus den Befunden ergibt sich weiter, dass denselbe Muskeln die Stearinsäure in ihrer Fettzusammensetzung fehlt.

5. *Isolierung der freien Fettsäuren.* Wie man aus Tabelle II ersieht, beträgt die Säurezahl der Körperfette der Schlangen 50–60. Man kann also in der D-Fraktion die präformierten freien Fettsäuren aufsuchen. Wird D-Fraktion mit Schwefelsäure angesäuert und mit Äther extrahiert, so gehen die freien Fettsäuren in den Äther über. Der Ätherextrakt wurde nach dem Verdunsten des Äthers mit Twitschellschen Verfahren in festen und flüssigen Säuren getrennt. Die regenerierten freien Säuren wurden weiter entweder als Methylester oder als Lithiumsalz fraktioniert.

Aus 4,0 g der rohen Fettsäure von Kobramuskeln (*Naja naja atra*) wurden 0,39 g Palmitinsäure, 0,56 g Stearinsäure und 1,2 g Oleinsäure rein isoliert.

3,385 mg Subst.	9,320 mg CO ₂ ,	3,750 mg H ₂ O.
-----------------	----------------------------	----------------------------

3,530 mg "	9,745 mg "	3,935 mg "
------------	------------	------------

Ber. für C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C 75,00	H 12,50
---------------------------------------------------------	---------	---------

Gefunden:	75,09	12,39
-----------	-------	-------

	75,29	12,47
--	-------	-------

3,130 mg Subst.	8,695 mg CO ₂ ,	3,525 mg H ₂ O.
-----------------	----------------------------	----------------------------

3,340 mg "	9,265 mg "	3,745 mg "
------------	------------	------------

Berechnet für C ₁₈ H ₃₄ O ₂	C 75,97	H 12,76
--------------------------------------------------------------	---------	---------

Gefunden:	75,76	12,60
-----------	-------	-------

	75,65	12,54
--	-------	-------

Die Verbindung, die als Oleinsäure angenommen wurde, zeigte die Jodzahl 89,1, also in guter Übereinstimmung mit derselben der Oleinsäure.

LITERATUR.

Grün u. Halden (1929): Analyse der Fette u. Wachse., 2, 417–419.

Oikawa (1925): Jl. Biochem., 5, 58.

CHEMIE DER SCHLANGEN.

III. Über die Fermente der Schlangenorgane.

VON

HIROYUKI IMAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 25. September 1939)

Das heterogene, chemische System der Zellen ist durch seine grosse Reaktionsfähigkeit ausgezeichnet. Zwar ist es möglich, dass bei dieser Reaktionsfähigkeit die Heterogenität des Protoplasmas eine Rolle spielt, indem sie besondere, die chemischen Reaktionen beschleunigende und regulierende Verhältnisse schafft. Indessen ist es wahrscheinlich, dass der chemische Charakter der Stoffe, die die Zellen produzieren, für die Reaktionsfähigkeit die wichtigste Rolle spielt.

Wir sind berechtigt anzunehmen, dass alle tiefgehenden chemischen Umsetzungen, welche sich in lebenden Zellen abspielen, sich durch die Wirkungen der darin vorhandenen Fermente erklären lassen.

Trotz der intensiven Bearbeitung, die das Gebiet der Fermentwirkung in den letzten Jahren erfahren hat, konnte in keinem Fall die Lokalisation einzelnen Fermente vergleichend-biochemisch klar gestellt werden. Offenbar wäre es von Interesse, eine Beziehung festzustellen zwischen dem Fermentgehalt der verschiedenen Organe und der Tierarten.

Meine Untersuchungen erstreckten sich einmal auf die Frage des Vorkommens der verschiedenen Fermente in einzelnen Organen der Schlangen, u. z. der *Elaphe carinata*. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sowie das eigenartig verschiedene Verhalten der Fermentlokalisation liess es uns wünschenswert erscheinen, sie mit den früher an anderen Tierarten ausgeführten Untersuchungen zu vergleichen.

Von den verschiedenen Fermenten wurden hier Amylase, Lipase, Pepsin, Trypsin, Urease, Arginase, Glycero-phosphatase und Fruktose-monophosphatase untersucht.

Einzelne Organe wurden nach dem Zerreiben mit Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder Glycerin extrahiert, mit der Substratlösung durchgemischt und unter Zusatz von Toluol bei 37–38° digeriert. Bei dem Magen und Darm wurde die Schleimhaut zum Versuche verwendet.

EXPERIMENTELLE BELEGE.

1. Amylasewirkung der Organe.

Einzelne Organe oder Magendarmschleimhaut wurden je mit 100 ccm Glycerin extrahiert. Man braucht den Glycerinextrakt als Fermentlösung. Die Digestionsflüssigkeit wird folgendermassen zusammengesetzt:

- 5 ccm Fermentlösung.
- 20 ccm Substratlösung (2 proz. Stärkelösung).
- 10 ccm Phosphatpuffer (pH=6,8).
- 1 ccm *n*-NaCl-lösung.
- 14 ccm Wasser.

Nach 24 stündiger Digestion wurde die abgespaltene Glukose nach dem Bertrand'schen Verfahren bestimmt.

Die Resultate der einzelnen Versuche sind im folgenden tabellarisch niedergelegt.

TABELLE I.

Arten der Organe	Gewicht der verwendeten Organe (g)	Menge von KMnO_4 (ccm)		Abgespaltene Stärke (%)
		Berechnet	Gefunden	
Magen	11,5	48,0	20,5	42,70
Darm	15,0	"	18,0	37,50
Milz	3,5	"	10,5	21,87
Pankreas	13,0	"	16,5	34,58
Leber	15,0	"	7,5	15,62
Niere	16,0	"	15,0	31,25
Hoden	15,0	"	13,5	28,12

2. Untersuchung der Lipase.

10 cem der Fermentlösung, die man durch Suspension der zerkleinerten Organe in 5 facher Wassermenge darstellt, wurden mit 5 cem Olivenöl oder 25 cem Tributyrinlösung (10 g Tributyrin in 400 cem Wasser) als Substrat versetzt. Dem Gemisch hat man als Puffer und Aktivator 2 cem *n*-Ammoniakchlorammonlösung (pH=8,9), 0,5 cem 2 proz. CaCl₂-lösung und 0,5 cem 3 proz. Eialbuminlösung zugesetzt. Nach der Digestion wurde die Aciditätszunahme mit *n*/10-KOH titrimetrisch bestimmt.

TABELLE II a.

Arten der Organe	Gewicht des verwendeten Organs	Substrat	Aciditätszunahme (cem <i>N</i> /10-KOH)
Magen	6,0 g	Olivenöl	0,6
Darm	10,0 g	"	1,1
Leber	10,0 g	"	1,3
Pankreas	4,5 g	"	12,1
Milz	1,0 g	"	0,1
Niere	10,0 g	"	0
Hoden	1,0 g	"	0

TABELLE II b.

Arten der Organe	Gewicht des verwendeten Organs	Substrat	Aciditätszunahme (cem <i>N</i> /10-KOH)
Magen	8,0 g	Tributyrin	8,6
Darm	15,0 g	"	9,0
Leber	15,0 g	"	8,1
Pankreas	3,0 g	"	16,1
Milz	0,5 g	"	0
Niere	9,1 g	"	0,1

3. Pepsinwirkung der Organe.

Das Verdauungsgemisch wird wie folgt dargestellt:

10 cem Kaseinlösung (10 g Casein, 8 cem NaOH-lösung, 250 cem H₂O, auf dem Wasserbad unter Erwärmung gelöst.)

5 ccm Fermentlösung (Organe mit 5 facher Glycerinmenge extrahiert.)

15 ccm $n/15\text{-HCl}$.

Unter Zusatz von Toluol wird das Gemisch 24 Stunden lang digeriert und dann nach Vorhardt und Löhnelein (1903) mit $n/10\text{-NaOH}$ titriert. Es zeigt sich folgendes:

TABELLE III.

Arten der Organe	0,1-n-NaOH-Lösung in ccm		Zunahme der $N/10\text{-NaOH}$ -Lösung (ccm)
	Vor d. Verdauung	Nach d. Verdauung	
Magen	1,10	2,70	1,60
Darm	1,20	1,60	0,40
Leber	1,15	1,15	0
Pankreas	1,20	1,25	0,05
Milz	1,20	1,20	0
Niere	1,25	1,25	0

4. Untersuchung der Trypsinwirkung.

Die Trypsinwirkung wurde nach Waldschmidt-Leitz (1923) ermittelt.

5 ccm Peptonlösung (3 proz.), 5 ccm Fermentlösung (= mit 10fachem Volumen Wasser verdünnte Organsuspension) und 1 ccm n -Ammoniak-Chlorammon-Puffer ($\text{pH}=8,9$) werden gemischt und digeriert. Die Enterokinase wird nach seinem Verfahren dargestellt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle IV ersichtlich.

TABELLE IV.

Arten der Organe	Menge der $N/5\text{-KOH}$ in ccm		Der Aciditätszuwachs (ccm $N/5\text{-KOH}$)	Aciditätszunahme nach Einwirkung von Enterokinase
	Versuch	Kontrolle		
Magen	9,90	9,90	0	1,55
Darm	11,15	10,05	1,10	
Leber	10,75	10,10	0,65	
Pankreas	10,13	9,90	0,23	
Milz	9,40	9,40	0	
Niere	9,95	9,95	0	
Hoden	9,74	9,74	0	

5. *Ureasewirkung der Organe.*

Einzelne Organe wurden mit ihrer 10fachen Menge Glycerin extrahiert, dazu 5 ccm 1/10-mol. Harnstofflösung (- 0,03 g) als Substrat und 10 ccm 1/15-mol. Phosphatpuffer (pH = 7,0) versetzt. Nach 24 Stunden wurde das abgespaltene Ammoniak bestimmt. 0,03 g Harnstoff geben nach vollständiger Spaltung 0,014 g Ammoniak-Stickstoff.

Die Ergebnisse lassen sich aus folgender Tabelle ansehen.

TABELLE V.

Arten der Organe	Menge d. zugesetzten Harnstoffes	Ammoniak-Stickstoff (g)		Abgespalt. Harnstoff (%)
		Berechnet	Gefunden	
Magen	0,03 g	0,014	0,0028	20,0
Darm	"	"	0	0
Leber	"	"	0	0
Pankreas	"	"	0	0
Milz	"	"	0	0
Niere	"	"	0	0
Hoden	"	"	0	0

6. *Die Stärke der Arginasewirkung einzelner Organe.*

In unserem Laboratorium (1925–1934) wurde schon festgestellt, dass sich die Arginase, die bei Säugetieren hauptsächlich in der Leber vorkommt, in der Niere bei Vögeln, in der Leber und zum Teil auch in der Niere bei den Amphibien und in der Leber beim Fisch findet. Dass sich die Argininspaltung auch in Schildkrötenorganen vollzieht und die Niere sehr kräftig hydrolytisch spaltend wirkt, ist auch konstatiert. In Schlangenorganen habe ich dasselbe Verhalten gefunden, welches sehr beachtenswert erscheint, weil man sich vorstellen kann, dass sich die fermentativen Vorgänge im Reptilienorganismus zu denen des Vogels sehr ähnlich wie ihre morphologischen Verwandtschaftsverhältnisse verhalten.

5 ccm Arginincarbonatlösung (0,0417 g) wurden mit 5 ccm Organsuspension und Glycin-NaOH-Puffer (pH=9,5) gemischt. Nach 48 stündiger Digestion wurde das Digerat mit *n*/15-Phosphatpuffer bis pH=7 versetzt und Sojabohnen-Urease zugesetzt. Nach

24 Stunden wurde das aus Harnstoff gebildete Ammoniak ermittelt.

Tabelle VI zeigt die Ergebnisse.

TABELLE VI.

Arten der Organe	Verwendete Menge des Organs (g)	Zugesetztes Arginin-carbonat (g)	Harnstoff		
			Berechnet (g)	Gefunden (g)	Gefunden (%)
Niere	4,6	0,0417	1,0144	0,0121	84,58
Leber	8,7	"	"	0,0090	62,50
Milz	0,5	"	"	0	0
Pankreas	2,1	"	"	0	0
Muskel	3,0	"	"	0,0009	6,60
Darm	3,0	"	"	0	0
Hoden	3,0	"	"	0	0

7. Untersuchung der Phosphatasewirkung der einzelnen Organe.

Vor mehreren Jahren hat M. Tomita (1922) die Nierenphosphatasen gefunden, die aus den Salzen der Zuckerphosphorsäure anorganisches Phosphat abspalten. Nachdem hat man eine intensive Bearbeitungen der Phosphatasewirkungen durchgeführt. Bei den Schlangen habe ich festgestellt, dass unter den von mir festgestellten Bedingungen der Niere der Schlangen die kräftigste Phosphatasewirkung zukommt.

Einzelne Organe wurden mit 5fachen Mengen physiologischer Kochsalzlösung extrahiert. 25 ccm des Extraktes wurden mit 5 ccm Na-glycerophosphatlösung (=0,4 g) oder 50 ccm 1%iger Ca-fruktose-monophosphatlösung (=0,5 g) versetzt. Nach 72 stündiger Digestion wurde das abgespaltene anorganische Phosphat nach Neumann ermittelt. Tabelle VII zeigt die Resultate.

Die bei den verschiedenen Versuchen erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle VIII kurz schematisch verzeichnet.

TABELLE VII.

Arten der Organe	Abgespaltene Menge von P_2O_5 aus			
	Na glycerophosphat (0,4 g)		Ca-fruktose monophosphat (0,5 g)	
	mg	%	mg	%
Niere	35,00	99,29	4,13	25,85
Leber	18,93	53,70	3,39	21,22
Darm	34,81	98,75	1,52	9,52
Muskel	7,10	20,14	3,43	21,47
Magen	3,56	10,10	—	—
Pankreas	1,78	5,05	1,02	6,40
Milz	6,15	17,45	2,02	11,89
Hoden	28,41	80,60	2,41	15,09
Lunge	1,78	5,05	2,28	14,28

TABELLE VIII.

Arten der Organe	Arten der Fermente							
	Amylase	Lipase	Pepsin	Trypsin	Urease	Arginase	Phosphatase	
							Glycero-	Frukto-
Magen	++	+	+	—	+		+	
Darm	++	+	±	+	—	—	+++	+
Leber	+	+	—	+	—	++	++	+
Pankreas	++	++	±	+	—	+	+	+
Milz	+	—	—	—	—	—	+	+
Niere	++	—	—	—	—	+++	+++	++
Lunge							+	+
Muskel							+	+
Hoden	+	—	—		—	—	++	+

LITERATUR.

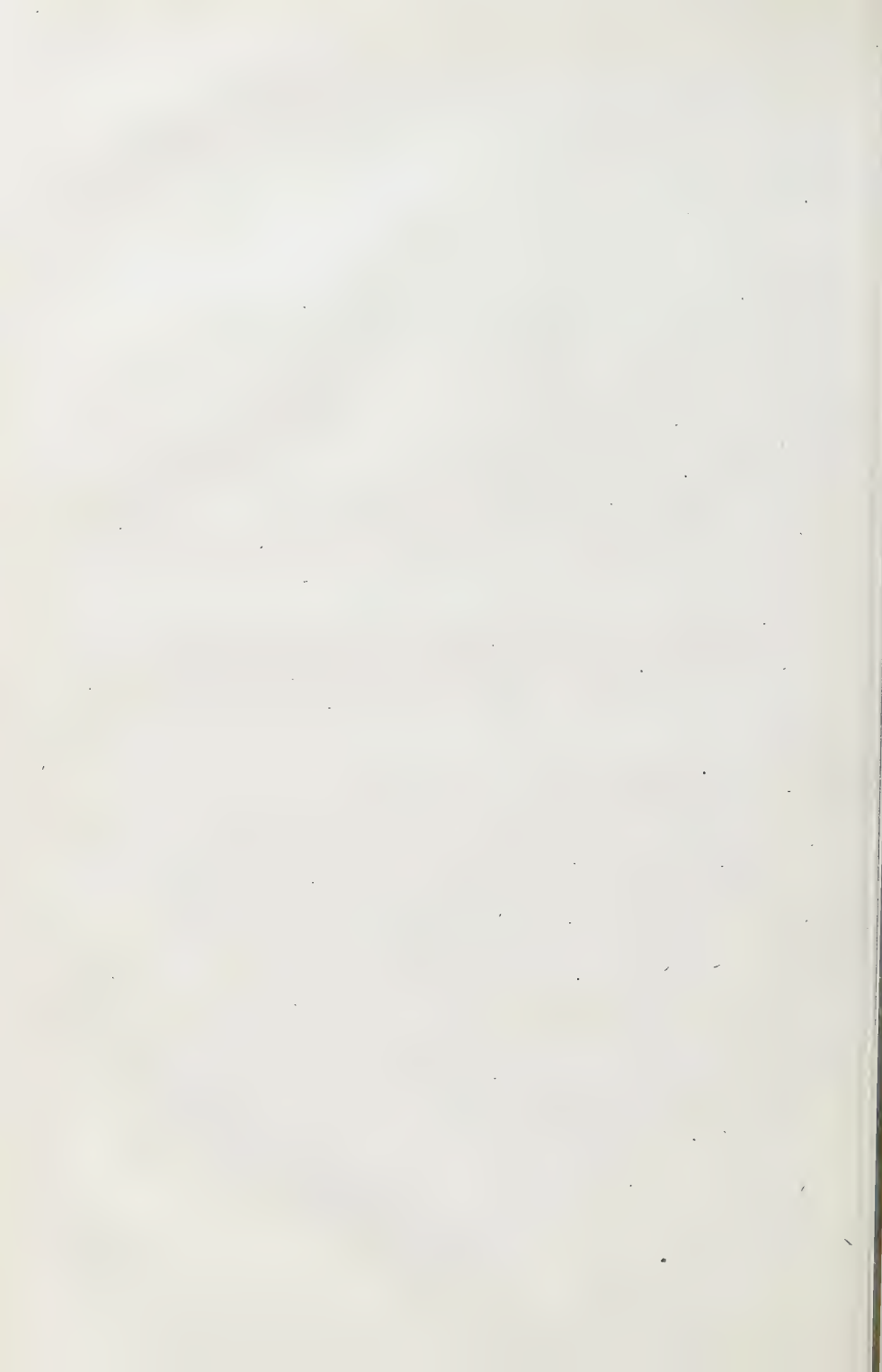
Kumon, T. (1933): Jl. of Biochem., 18, 145.

Sendju, Y. (1925): Jl. of Biochem., 5, 229.

Tomita, M. (1922): Biochem. Zs., 131, 161–170.

Volhardt u. Löhnlein (1903): Hofmeister's Beitr., 7, 120.

Waldschmidt-Leitz (1923): H-S., 132, 195.



CHEMIE DER SCHLANGEN.

IV. Über die Gallensäuren in der Schlangengalle.

VON

HIROYUKI IMAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 25. September 1939)

Es ist ein grosses Verdienst von Herrn Prof. Shimidzu und seinen Mitarbeitern (1927–1935), durch eine Reihe mühevoller Untersuchungen, welche die Gallensäuren von verschiedenen Tierarten betreffen, der Erforschung des Sterinstoffwechsels einen Weg vorbereitet zu haben. Ihre Untersuchungen haben ergeben, dass je nach den Tieren verschiedene Arten von Gallensäuren vorkommen. Was die Gallensäuren der Schlangen betrifft, so haben Iwato und Watanabe (1935) berichtet, dass *Elaphe quadrigata* in der Galle hauptsächlich Taurocholol enthält. Andererseits hat V. Deulofeu (1924) das Vorhandensein von Cholsäure in der Galle von *Crotalus terrificus* und *Bothrops alternata* festgestellt.

In Formosa kommen viele Arten von Schlangen vor und ich hatte Gelegenheit, eine zur Untersuchung ausreichende Menge Galle von *Elaphe carinata* und *Bungarus multisetus* zu bekommen und diese bei den chemischen Untersuchungen zu verwenden, deren Resultate im folgenden mitgeteilt werden.

1. *Versuche bei Elaphe carinata.* 147 Gallenblasen von *Elaphe carinata* wurden getrocknet, mit absolutem Alkohol extrahiert. Nach dem Verdampfen des Alkohols wurde der Rückstand in Wasser gelöst und mit 5 proz. Eisenchloridlösung niedergeschlagen. Aus dem Filtrat wurde das Eisen durch Natronlauge entfernt, mit Salzsäure kongosauer gemacht und dann mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt diente zur Cholesterindarstellung.

Der ätherunlösliche Teil wurde nach der Neutralisation mit Natronlauge stark eingeeengt und dann mit 30 g Kaliumhydroxyd

in alkoholischer Lösung 40 Stunden lang gekocht. Nach gutem Kühlen wurde mit konzentrierter Salzsäure kongosauer gemacht. Das ausgefallene Harz wurde mit viel Wasser gewaschen, in Ammoniak gelöst und unter Erwärmung mit Bariumchlorid gefällt. Das niedergeschlagene Bariumsalz wurde mit Salzsäure behandelt, nach dem Eindampfen mit Alkohol heiss extrahiert und in Eischrank stehen gelassen. Die sich hierbei bildenden Krystalle wurden abgesaugt, mit absolutem Alkohol ausgewaschen und getrocknet. Ausbeute 6,9 g.

4,315 mg Subst.	10,800 mg CO ₂ .	3,740 mg H ₂ O.		
3,500 mg Subst.	8,790 mg "	3,030 mg "		
0,1787 g Subst.	4,23 ccm n/10-NaOH.			
Ber. für C ₂₄ H ₄₀ O ₆ + H ₂ O	C 68,18	H 10,00	Mol. Gew.	426
Gefunden	68,26	9,70		422,4
	68,49	9,69		

Der Ätherauszug wurde mit 10 g Kaliumhydroxyd in alkoholischer Lösung 12 Stunden lang erhitzt. Durch Ätherextraktion wurden 0,3 g Krystalle vom Schmelzpunkt 146° erhalten, welche durch Mischschmelzpunkt und Farbenreaktionen als Cholesterin identifiziert wurden.

2. *Versuche bei Bungarus multinctus*. 100 Gallenblasen von *Bungarus multinctus*, deren Inhalt 114,9 g beträgt, wurden in derselben Weise wie bei *Elaphe carinata* auf Gallensäuren verarbeitet. Daraus wurden nur 0,5 g Cholsäure in reiner Form isoliert. Das Cholesterin wurde in freier Form nur mit 0,08 g erhalten, als Digitonid wurden noch 0,1 g festgestellt.

3,570 mg Subst.	8,970 CO ₂ .	3,160 mg H ₂ O.		
Ber. für C ₂₄ H ₄₀ O ₆ + H ₂ O	C 68,18	H 10,00		
Gefunden	68,53	9,90.		

Aus dem Filtrat der Chlorbarium-Fällung konnte Desoxycholsäure nicht isoliert werden. Aus dem Eisenniederschlag wurde auch keine andere Gallensäure erhalten.

LITERATUR.

Deulofeu, V. (1924): H-S, 229, 157.

Iwato und Watanabe (1935): Jl. of Biochem., 21, 211.

Shimidzu, T. (1935): Chemie u. Physiologie d. Gallensäuren, 47-52.

CHEMIE DER SCHLANGEN.

V. Über die anorganischen Bestandteile der Schlangemuskeln.

Von

HIROYUKI IMAMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität zu Taihoku.
Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 25. September 1939)

Ein vergleichend-biochemisches Studium des Muskelgewebes erscheint von mehreren Gesichtspunkten aus einladend. Unsere Kenntnisse von den anorganischen Bestandteilen der Muskeln sind ausserordentlich lückenhaft und dürftig. Systematische Untersuchungen über die Muskelaschen bei den Schlangen scheinen niemals angestellt worden zu sein, was uns angeregt hat, diesen Gegenstand einer exakten Untersuchung zu unterwerfen.

Meine Untersuchung beschränkte sich im wesentlichen auf den Gehalt des Muskels an Salzionen u. z. K, Na, Ca, Mg, Cl, $-PO_4$, $-SO_4$, $-SiO_3$; als Material wurde von jeder Schlangenart die am besten zugängliche Spezies ausgewählt. Von den Giftschlangen wurden *Naja naja atra*, *Bungarus multicinctus* und *Trimeresurus mucrosquamatus*, und von den ungiftigen Schlangen *Elaphe carinata*, *Elaphe taineurus* und *Ptyas mucosus* verwendet.

Das untersuchte Fleisch wurde stets ganz frisch verarbeitet. Die mit blossen Auge sichtbaren Blutgefässe, Sehnen, Nerven und das Fett wurden sorgfältig abpräpariert und das so gereinigte Fleisch wurde nach Zerkleinerung im Trockenschrank allmählich getrocknet und im Exsiccator zu konstantem Gewicht gebracht. Die Mengenverhältnisse der Trockensubstanz und des Wassers sind in Tabelle I verzeichnet.

Bei Betrachtung der hier angeführten Tabelle sieht man, dass der Wassergehalt des Fleisches in den verschiedenen Schlangenarten keine grosse Schwankung aufweist.

TABELLE I.

Arten der Schlangen	Menge des verwendeten Fleisches. g	Menge der Trocken- substanz. g	Wassergehalt	
			g	%
<i>Naja naja atra</i>	171,10	31,60	139,50	76,97
<i>Bungarus multicinctus</i>	138,40	29,80	108,60	77,20
<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	156,10	34,80	121,30	77,70
<i>Elaphe taineurus</i>	134,40	34,90	99,50	77,82
<i>Elaphe taineurus</i>	189,70	44,70	145,00	77,64
<i>Ptyas mucosus</i>	173,70	42,70	131,00	75,41

Die Trockensubstanz wurde dann sorgfältig verkohlt und verascht. Der Wasserauszug, worin die in Wasser löslichen Aschenbestandteile enthalten waren, wurde auf dem Wasserbade eingengt, sein Volumen durch Auffüllen in einem geeichten Messkolben bestimmt, ein aliquoter Teil davon für die Bestimmungen der einzelnen Stoffe entnommen und die dabei gefundenen Werte der Stoffe auf das Gesamtvolumen des Wasserauszuges berechnet. Die in Wasser nicht löslichen Aschenbestandteile löste man in verdünnter Salzsäure, verdünnte mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen und verwendete einen aliquoten Teil zu Bestimmungen der alkalischen Erden, der Schwefelsäure und der Phosphorsäure. Die Mengen der in Rede stehenden Stoffe sind zu denjenigen der in Wasserauszügen vorhandenen gleichnamigen Stoffe addiert und ihre Summe in der Tabelle eingetragen. Der in Salzsäure nicht lösliche Rückstand wurde auf Kieselsäure verarbeitet.

Zur Bestimmung des Chlors bediente ich mich der Methode von Volhard. Die Schwefelsäure wurde durch Salzsäure und Bariumchlorid gefällt und als Bariumsulfat abgewogen. Die Phosphorsäure wurde zuerst mit Magnesiainischung in der Kälte gefällt und dann auf bekannte Weise in das Phosphorsäuremolybdat übergeführt. Hierin wurde sodann die Phosphorsäure nach der

Vorschrift von Neumann bestimmt. Der Kalk wurde aus einer mit essigsäurem Natron versetzten Lösung durch oxalsaures Ammon als oxalsaurer Kalk gefällt, durch starkes Glühen in Ätzkalk übergeführt und dann gewogen. Aus der vom Calciumoxalat abfiltrierten Lösung fällte man das Magnesium durch Übersättigung mit Ätzammoniak als phosphorsaure Ammonmagnesia aus, verwandelte die letztere auf die übliche Weise durch Glühen in pyrophosphorsaure Magnesia und berechnete aus der gewogenen pyrophosphorsäuren Magnesia die Magnesia. Zur Bestimmung des Kaliums und des Natriums wurden die beiden Alkalien nach möglichster Entfernung der anderen Aschenbestandteile in Chloride übergeführt, als solche gewogen und dann das Kalium als Kaliumplatinchlorid bestimmt. Durch Subtraktion des Chlorkaliums von dem vorher gefundenen Gewichte der Summe der beiden Chloralkalien wurde die Menge des Chlornatriums gefunden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle II enthalten.

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Mineralbestandteile, abgesehen von Chloriden, schwankt nicht in breiten Grenzen. Unter den Muskelaschen der Schlangen steht nach meiner Untersuchung das Phosphor im Vordergrund, dann kommen Sulfate und Alkalien.

Frage man sich nun nach der Rolle des Phosphors und des

TABELLE II a.

Arten der Schlangen	Menge des verwendet. Fleisches g	Aschenbestandteile							
		K ₂ O		Na ₂ O		CaO		MgO	
		g	%	g	%	g	%	g	%
<i>Naja naja atra</i>	171,10	0,026	0,153	0,029	0,171	0,006	0,035	0,003	0,017
<i>Bungarus multicinct.</i>	138,40	0,025	0,181	0,023	0,166	0,005	0,040	0,002	0,014
<i>Trimeresurus mucrosquam.</i>	156,10	0,024	0,153	0,023	0,147	0,007	0,044	0,002	0,012
<i>Elaphe carinata</i>	134,40	0,014	0,107	0,026	0,195	0,005	0,037	0,002	0,015
<i>Elaphe taineurus</i>	189,70	0,019	0,100	0,033	0,174	0,004	0,021	0,003	0,016
<i>Ptyas mucosus</i>	173,70	0,025	0,144	0,026	0,150	0,006	0,034	0,002	0,011

TABELLE II b.

Arten der Schlangen	Menge des verwendet. Fleisches g	Aschenbestandteile							
		Cl		P ₂ O ₅		SO ₃		SiO ₂	
		g	%	g	%	g	%	g	%
<i>Naja naja atra</i>	171,10	0,160	0,093	0,788	0,460	0,025	0,149	0,007	0,004
<i>Bungarus multicinct.</i>	138,40	0,085	0,061	0,641	0,463	0,013	0,094	0,004	0,003
<i>Trimeresurus mucrosquam.</i>	156,10	0,160	0,102	0,627	0,402	0,021	0,136	0,007	0,004
<i>Elaphe carinat</i>	134,40	0,170	0,126	0,576	0,428	0,026	0,195	0,006	0,004
<i>Elaphe taineurus</i>	189,70	0,090	0,047	0,860	0,453	0,025	0,132	0,010	0,005
<i>Ptyas mucosus</i>	173,70	0,115	0,066	0,859	0,494	0,024	0,138	0,009	0,005

Schwefels für die Muskeltätigkeit, so muss man zugeben, dass die Bedeutung dieser Körper letzten Endes noch dunkel ist und so macht sich gegenwärtig die Notwendigkeit neuer Arbeiten fühlbar, welche den Phosphor- und Schwefelmetabolismus des Muskels beleuchten.

UNTERSUCHUNG DES PHOSPHATIDUMSATZES.

Über die Menge des hämolysierten Blutes, benutzt in der
Untersuchung des "Einflusses der Injektion des
hämolysierten Blutes auf den Phos-
phatidumsatz der Milz."*

VON

SEKISEN KAN.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 28. September 1939)

Zur Funktionsprüfung des reticuloendothelialen Systems wird gewöhnlich wegen der Phagocytose des Gewebes die kolloidale Lösung von verschiedenen Arten (Suspensoid oder Emulsoid) zur sogenannten Blockierungsprüfung angewendet, wobei zu bedauern ist, dass die Dosis dieser Substanzen, die für das Lebewesen Fremdkörper sind, auf physiologischer Grundlage nicht genau zu bestimmen ist.

Die Menge des täglichen Umsatzes der Erythrocyten wird nach der Untersuchung von allen Seiten auf ca. 1/30 der ganzen Menge der Blutkörperchen veranschlagt. Die durchschnittliche Gesamtblutmenge des gesunden Menschen beträgt 74 ccm** pro kg Körpergewicht. Beträgt das Volumen des Blutkörperchens durchschnittlich 42% von der Gesamtblutmenge,** so beläuft sich die Menge der Erythrocyten pro kg Körpergewicht auf 31 ccm. Also beträgt die Menge des täglichen Umsatzes Erythrocyten pro kg Körpergewicht durchschnittlich ca. 1 ccm, die aber im krankhaften Zustand noch erhöht wird, wie bei Malaria, Schwarzwasserfieber, und paroxymaler Hämoglobinurie. Und da das reticuloendotheliale System, besonders die Milz, welche als Grab der Erythrocyten bezeichnet wird, ein wesentliches Organ des Hämoglobinumsatzes

* Siehe Kan (1938) in d. Literatur.

** Komiya (1935), Nippon-Naikagakkai-Zassi, 23 (Nr. 2), 170.

ist, so wird der Vermutung Ausdruck gegeben, dass in der Milz verschiedene Vorgänge anschliessend an die Erledigung der Zerfallprodukte der Erythrocyten in Erscheinung treten.

Hashimoto (1933) hat bei normalen Hunden durch intravenöse Injektion des heterogenen sowie autogenen hämolysierten Blutes eine vorübergehende Vermehrung der Gallensäure des Blutes hervorgerufen. Hirota (1934) hat bei normalen Hunden durch intravenöse Injektion des homogenen hämolysierten Blutes eines anderen Hundes die Vermehrung der Cholesterinmenge festgestellt, die eine Stunde nach der Injektion erfolgt und 4-6 Stunden später den maximalen Wert erreicht. Beide Autoren haben diesen Vorgang auf den reizenden Einfluss der Bestandteile des hämolysierten Blutes auf das reticuloendotheliale System zurückgeführt.

Ich habe bei den Untersuchungen des Phosphatidumsatzes (Kan, 1938, 1939) nicht nur festgestellt, dass bei normalen Hunden die intravenöse Injektion des homogenen hämolysierten Blutes eine bedeutende Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Vollblut hervorruft, während diese Injektion bei entmilzten Hunden eine Verminderung verursacht, sondern auch mitgeteilt, dass ich Bestandteile des hämolysierten Blutes in Hämoglobin und Fettstoff eingeteilt habe und durch Injektion des Hämoglobins eine ähnliche Vermehrungskurve des Lipoid-Phosphors im Vollblut wie durch die Injektion des hämolysierten Blutes selbst feststellen konnte, dass also sich die Menge des Lipoid-Phosphors im Vollblut bei der Erledigung des Hämoglobins nach der Injektion des hämolysierten Blutes vermehrt, was uns vermuten lässt, dass in der Milz der Hämoglobinumsatz und der Phosphatidumsatz in einer engen Beziehung stehen müssen.

Bei diesen Untersuchungen habe ich 5,0 ccm vom 3fach verdünntem hämolysierten Blut pro kg Körpergewicht gebraucht. Ist aber diese Dosis denn geeignet? Oder gibt es eine andere Dosis, die auf den Zusammenhang der Milz mit dem Phosphatidumsatz einen grösseren Einfluss ausüben kann? Nehmen wir nun an, dass die Gesamtblutmenge eines normalen Hundes ca. $1/11^*$ von

* Sato (1935): Jikken-Ketzueki-Gaku, 30.

Körpergewicht beträgt, so beläuft sich die Gesamtblutmenge des Hundes von 11 kg Körpergewicht auf 1 kg. Beträgt das Volumen der Blutkörperchen durchschnittlich etwa 38%* von der Gesamtmenge des Blutes, so wiegt die Gesamtmenge der Erythrocyten 380 g. Wenn beim Hunde der Umsatz von $1/30$ der Gesamtmenge der Erythrocyten ebenfalls wie beim Menschen erfolgt, so beträgt die Umsatzmenge 12,7 g. 12,7 g Erythrocyten enthalten also, wenn das Hämoglobin 33% der Erythrocyten beträgt, 4,19 g Hämoglobin, d. h. die Tagesdosis des physiologischen Hämoglobinumsatzes.

Gebraucht man nun bei einem Hunde von 11 kg Körpergewicht 10,0 ccm des 3fach verdünnten hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht, so beträgt das im hämolysierten Blut enthaltene Hämoglobin ca. 13,2 g, nämlich 3,2fach so viel wie die Tagesdosis des physiologischen Hämoglobinumsatzes. Gebraucht man aber 5,0 ccm desselben hämolysierten Blutes, so beträgt das Hämoglobin das 1,6fache. Gebraucht man ferner 2,5 ccm, so beträgt es natürlicherweise das 0,8fache.

Beim Experiment habe ich, wie schon erwähnt, Bestandteile des hämolysierten Blutes in Hämoglobin und Fettstoff eingeteilt und diese Substanzen einzeln injiziert, wobei ich als Hämoglobin Hämoglobin in lamellis Merck und selbsthergestelltes Rinderhämoglobin benutzte.

In dem vorliegenden Experiment nun habe ich die Injektion von 3,2fach und 0,8fach so viel Hämoglobin wie die Tagesdosis des physiologischen Umsatzes des Hundhämoglobins, nämlich von 10,0 ccm und 2,5 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht vorgenommen. So möchte ich nun die Ergebnisse mitteilen und zugleich sie jenen meiner vorigen Mitteilungen (Kan 1938, 1939), den Ergebnissen bei der Injektion von 1,6, 0,15, 0,2fach viel Hämoglobin, gegenüberstellen.

Bei der Injektion von 5,0 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht, d. h. 1,6fach so viel wie eine Tagesdosis des physiologischen Umsatzes des Hundshämoglobins (Kan, 1938), vermehrt sich Lipoidphosphor im Vollblut frühestens 30 Minuten nach In-

* Mayerson (1930): Anat. Record, 47, 243.

jektion des hämolysierten Blutes, spätestens 3 Stunden darauf, erreicht den maximalen Wert nach 7 Stunden und bleibt nach 48 Stunden noch immer höher als der Wert vor der Injektion. Der höchste Prozentsatz der Vermehrung beträgt aus 4 Fällen durchschnittlich 30,4%. Bei der Injektion von je 5,0 ccm von 1,16% Hämoglobininlösung (Hb. in lamellis Merck) und von 1,55% selbsthergestellter Hämoglobininlösung pro kg Körpergewicht (ca. 0,2fach so viel wie Tagesdosis des physiologischen Umsatzes), vermehrt sich Lipoid-Phosphor im Vollblut. Der höchste Prozentsatz der Vermehrung beträgt aus 3 Fällen durchschnittlich 24,6%, ein ähnliches Ergebnis zeigt die Injektion von 2,5 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht (Kan, 1939).

EXPERIMENT.

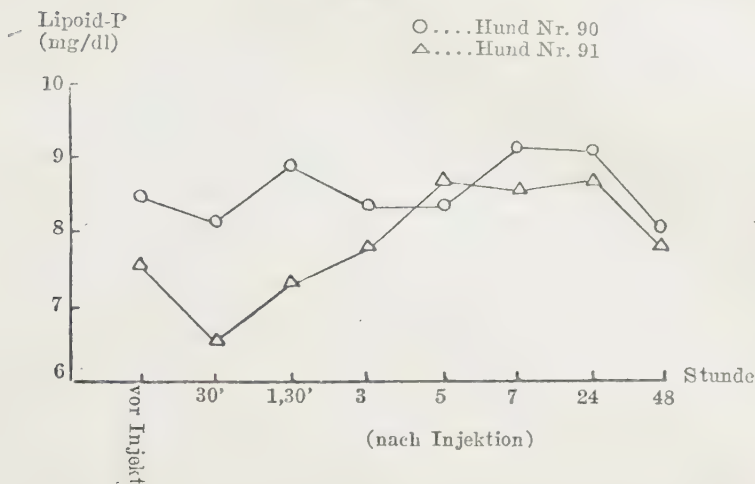
a. *Versuchsmethode.* Die Bestimmungsmethode des Lipoid-Phosphors des Blutes, Methode der Blutentnahme, Versuchstier, Herstellungsmethode des hämolysierten Blutes usw. sind dieselben wie in der vorigen Mitteilung (Kan, 1938). Die Injektion wurde in Vena auricularis und die Blutentnahme aus der Arteria femoralis vorgenommen.

b. *Bei der Injektion von 10,0 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht.* Die Menge des im benutzten hämolysierten Blut enthaltenen Hämoglobins entspricht, aus dem obigen berechnet, dem 3,2 fachen der Tagesdosis des physiologischen Hämoglobinumsatzes. Nach Injektion des hämolysierten Blutes vermehrt sich Lipoid-Phosphor im Vollblut, wie die Tabelle zeigt. Der höchste Prozentsatz der Vermehrung beträgt aus 2 Fällen durchschnittlich 12,2% und ist bedeutend niedriger als bei der Injektion von 5,0 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht. Bemerkenswert ist es, dass die Injektion der grösseren Dosis einen niedrigeren Prozentsatz der Vermehrung resultierte.

TABELLE I.

Hund-Nr.	Körper gew. (kg)	Lipoid-P im Vollbut (mg/dl)							
		Vor d. Injekt.	Nach d. Injektion						
			30'	1 St. 30'	3 St.	5 St.	7 St.	24 St.	48 St.
90 (♀)	5,0	8,48	8,18	8,91	8,37	8,37	9,29	9,18	8,18
91 (♂)	5,4	7,67	6,64	7,43	7,83	8,69	8,67	8,83	7,97

Fig. 1.



c. Bei der Injektion von 2,5 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht. Die Menge des hier benutzten hämolysierten Blut enthaltenen Hämoglobins entspricht, aus dem obigen berechnet, dem 0,8 fachen der Tagesdosis des physiologischen Hämoglobinumsatzes des normalen Hundes. Wie die Tabelle zeigt, vermehrt sich Lipoid-Phosphor im Vollblut nach der Injektion des hämolysierten Blutes. Der höchste Prozentsatz der Vermehrung beträgt aus 2 Fällen durchschnittlich 25,8% und ist etwas niedriger als bei der Injektion von 5,0 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht.

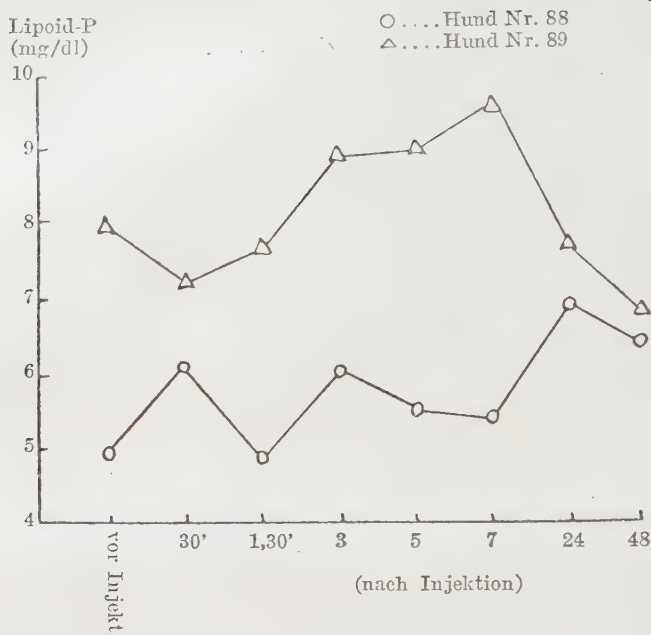
ZUSAMMENFASSUNG.

Fasse ich nun die Resultate dieses Experimentes und die in den vorigen Mitteilungen (Kan, 1938, 1939) zusammen, so habe

TABELLE II.

Hund-Nr.	Körper-gew. (kg.)	Lipoid-P im Vollblut (mg/dl)							
		Vor d. Injekt.	Nach d. Injektion						
			30'	1 St. 30'	3 St.	5 St.	7 St.	24 St.	48 St.
83 (♀)	5,6	4,94	6,08	4,86	6,02	5,51	5,40	6,89	6,43
89 (♀)	6,2	7,99	7,16	7,67	8,95	8,96	9,59	7,07	6,83

Fig. 2.



ich folgendes zu sagen:

Die intravenöse Injektion von 5,0 ccm, 10,0 ccm, 2,5 ccm des 3fach verdünnten hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht (von dem 1,6, 3,2, 0,8fachen der Tagesdosis des physiologischen Hämoglobinumsatzes) ruft bei normalen Hunden die Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Vollblut hervor, und zwar die Injektion von 5,0 ccm ruft die grösste Vermehrung hervor, dem folgt die Vermehrung durch die Injektion von 2,5 ccm, und die Vermehrung durch die Injektion von 10,0 ccm ist bedeutend niedriger als die beiden anderen. Die intravenöse Injektion von 5,0 ccm der 1,16% Hämoglobinlösung (Hb. in lamellis, Merck) und 1,55% selbsthergestellten Hämoglobinlösung pro kg Körpergewicht (von dem 0,15 und 0,2fachen der Tagesdosis des physiologischen Hämoglobinumsatzes) ruft bei normalen Hunden immer die Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Vollblut hervor. Der höchste Vermehrungsprozentsatz ist fast derselbe wie bei der Injektion von 2,5 ccm des

hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht.

Wie schon aus obigen Ergebnissen klar geworden ist, ruft die intravenöse Injektion von verschiedener Dosis des hämolysierten Blutes (oder des Hämoglobins) bei normalen Hunden jedesmal die Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Vollblut hervor, aber die Injektion von 5,0 ccm des hämolysierten Blutes pro kg Körpergewicht verursacht den höchsten Prozentsatz der Vermehrung des Lipoid-Phosphors. Über den engsten Zusammenhang, worin diese durch Injektion des hämolysierten Blutes (oder des Hämoglobins) hervorgerufene Vermehrung des Blut-Lipoid-Phosphors mit dem Hämoglobinumsatz im reticuloendothelialen System, besonders in der Milz, steht, ist schon genau in vorhergehenden Mitteilungen (Kan, 1938, 1939) erwähnt.

Die Überlegenheit des hämolysierten Blutes über verschiedene kolloidale Lösungen (Suspensoid oder Emulsoid), die bisher bei der Blockierungsprüfung des reticuloendothelialen Systems benutzt worden sind, bestehen darin, dass das Hämoglobin ein ständiger Bestandteil des Lebewesens ist, und dass die Dosis auf dem festen Grund variiert wird, weil der Umsatz der bestimmten Menge Hämoglobin täglich physiologisch vor sich geht.

Nagashima (1933) hat die Funktionsveränderung des reticuloendothelialen Systems mittels des Eisenzuckers und Kongorots untersucht und dieses Ergebnis mit dem aus der Produktionsfähigkeit des Immunkörpers betrachteten Ergebnis verglichen. Nach ihm ist der Funktionswert des reticuloendothelialen Systems je nach der Art und Menge der injizierten Flüssigkeit verschieden. Die Injektion der kleinen Dosis von Kollargol, Trypanblau und Carmin steigert die Funktion des reticuloendothelialen Systems, die aber mit der Vermehrung der injizierten Dosis absinkt. Auch die Injektion der kleinen Dosis der Tuschesuspension des Eisenzuckers steigert die Funktion des betreffenden Systems, die aber durch Vermehrung der injizierten Dosis herabsetzt wird, durch fernere Vermehrung zu steigen anfängt, jedoch durch die Injektion der grossen Dosis stark herabsetzt wird.

Zwischen der Wirkung des Hämoglobins auf das reticuloendotheliale System, besonders auf die Milz, und der Wirkung von

Kollargol, Trypanblau und Carmin in der Nagashima'schen Untersuchung scheint die Ähnlichkeit zu bestehen, dass der Vermehrungsprozentsatz des Blut-Lipoid-Phosphors bei der Injektion der grössten Dosis des hämolysierten Blutes, d. h. von 10,0 cem pro kg Körpergewicht, niedriger ist als bei jeder Injektion der kleineren Dosis, nämlich dass die Injektion der kleineren Dosis des hämolysierten Blutes die Funktion des reticuloendothelialen Systems, besonders der Milz, steigert und die Injektion der grösseren Dosis die Funktion des Systems herabsetzt.

LITERATUR.

- Hashimoto (1933): J. Kumamoto Med. Soc. (Jap. Edition), 9 (Nr. 10), 706.
Hirota (1934): J. Kumamoto Med. Soc. (Jap. Edition), 10 (Nr. 9), 1067.
Kan (1938): Kumamoto Med. J., 1 (Nr. 1), 1.
„ (1939): „ „ „, 1 (Nr. 3), 4.
Nagashima (1935): J. Kumamoto Med. Soc. (Jap. Edition), 9 (Nr. 3), 208.
Takata (1936): J. Biochem., 24 (Nr. 2), 257.

ÜBER DIE BESTIMMUNG DES GLUTATHIONS IM GEWEBE.

VON

ISAMU NUMATA.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Institutes in Tokyo.
Direktor: Dr. Akiji Fujita).

(Eingegangen am 6. Oktober 1939)

In der vorangehenden Mitteilung habe ich (Numata 1939) hervorgehoben, dass das Glutathion bei der Enteiweissung durch Hämoglobin oxydiert wird, was aber durch Behandlung mit CO völlig vermieden werden kann. Bei der Bestimmung des Glutathions im Gewebe ist ausserdem noch zu beachten, dass sich in manchen Geweben ein Ferment bzw. Fermentsystem befindet, welches Glutathion hydrolysiert und Cystein freimacht. Die Gegenwart eines solchen Ferments wurde schon von Fujita u. Iwatake (1935) bemerkt und es wurde derauf aufmerksam gemacht, dass man die Gewebe zur Glutathionbestimmung sofort nach Töten des Tieres gefrieren und schnell enteiweissen muss. Da damals keine zuverlässige quantitative Bestimmungsmethode des Cysteins neben Glutathion vorlag, war der Nachweis der Hydrolyse nicht einwandfrei. Wir (Fujita u. Numata 1939) haben aber indessen eine solche Methode ausgearbeitet. Wir sind daher jetzt imstande, diese Sache erneut zu prüfen. Meine diesbezüglichen Versuche bestätigten die fermentative Hydrolyse des Glutathions nach Töten des Tieres eindeutig. Um den Glutathiongehalt im Gewebe zu bestimmen, sind also zwei Punkte zu berücksichtigen: die fermentative Hydrolyse des Glutathions und die Oxydation des Glutathions durch Hämoglobin bei der Enteiweissung. Es soll die Aufgabe dieser Arbeit sein, das Verhalten der Hydrolyse unter verschiedenen Bedingungen zu erforschen und die Bestimmungsmethode des Gewebsglutathions festzustellen.

1. Hydrolyse des Glutathions im Gewebe.

Versuch 1. Die Leber wird sofort nach Töten des Meer-schweinchens behandelt. a) Zu 1 g Leber Zusatz von 5 ccm 4%iger Metaphosphorsäure → zerreiben → Zusatz von 4 ccm Wasser → mischen → zentrifugieren → photometrieren. b) Mit festem CO₂ gefrieren → zu 1 g Leber Zusatz von 5 ccm 4%iger Metaphosphorsäure und 4 ccm Wasser → zentrifugieren usw. c) 1 g Leber wird mit Wasser in der Kälte zerrieben → in modifiziertes Thunberg-Gefäß (Vgl. Fujita, Ebihara, Numata 1939) überführen (Wasser im Ganzen 8 ccm) → bei Zimmertemperatur, im CO₂, Zusatz von 1,0 ccm 20%iger Metaphosphorsäure → zentrifugieren usw. d) Wie bei c, aber ohne Abkühlen. e) Das Gewebe wird nach Abtöten des Tiers eine Stunde bei 20°C liegen gelassen. Dann weiter wie bei a behandelt. f) Nach Abtöten wird das Gewebe eine Stunde bei 20°C liegen gelassen. Weiter wie bei d behandelt.

TABELLE I.

Behandlung	Cystein mg%	Gesamt-Cystein mg%
a	4,9 ¹⁾	6,0
b	7,5 ¹⁾	7,5
c	15,0 ¹⁾	18,0
d	95,6	105,0
e	21,0	24,0
f	69,0	75,0

Wie die Ergebnisse von Tabelle I zeigen, findet keine Hydrolyse des Glutathions statt, wenn das Gewebe sofort nach Töten des Tiers mit Metaphosphorsäure behandelt wird. Das Ferment wird also durch Säure inaktiviert. Wenn man das Gewebe schnell gefriert und danach mit Säure enteiweisst, so findet man auch fast keine Hydrolyse. Dagegen wird die Hydrolyse²⁾

1) Bei vielen Fällen sind die Werte a, b und c gleich. Vgl. Tabelle V.

2) Cystein kann wenigstens teilweise auch durch Hydrolyse des Eiweisses entstehen, wöüber ich hier vorläufig dahinstelle.

sehr ausgeprägt (d), wenn man das Gewebe bei Zimmertemperatur zerreibt, aber weniger ausgeprägt (e) wenn man das Gewebe zuerst in der Kälte behandelt. Nach Liegenlassen des Gewebes bei 20°C wird die Hydrolyse deutlich bemerkbar (e.f.), auch wenn man das Gewebe direkt mit Säure zerreibt (e). Die Behandlung mit CO zur Vermeidung der Oxydation durch Hämoglobin bei der Enteiweissung, wie bei der Ascorbinsäurebestimmung (Vgl. Fujita, Ebihara u. Numata 1939), kann daher bei der Glutathionbestimmung im Gewebe nicht ohne weiteres angewandt werden.

2. Einfluss der Temperatur auf die Hydrolyse des Glutathions.

Versuch 2. Nach Töten des Meerschweinchens wird die Leber mit festem CO₂ gefroren → davon 2a g abgewogen → in das Zentrifugierglas gebracht → Zusatz von 1 a cem Wasser verschiedener Temperatur → 5 Minuten im Wasserbad verschiedener Temperatur belassen → eventuell Ersatz des verdampften Wassers (durch Abwägen) → Zusatz von Seesand → Zusatz von 10a cem 4%iger Metaphosphorsäure und 7a cem Wasser → zerreiben → zentrifugieren → photometrieren. Kontrollversuch wurde bei Zimmertemperatur (26°C) ausgeführt.

TABELLE II.

Temperatur des Wasserbads (°C)	Cysteingehalt (mg%)	
	Cystein	Gesamt-Cystein
70	37,5	43,5
90	11,3	10,5
100	9,0	10,5
Kontrolle (26°C)	9,8	10,5

Wie aus Tabelle II hervorgeht, geschieht die Hydrolyse nach 5 Minuten langem Liegenlassen bei 70° noch deutlich, während sie bei 90°C kaum mehr wahrnehmbar ist.

Versuch 3. Nach Töten des Meerschweinchens wird die Leber mit festem CO₂ gefroren → 2a g abgewogen → a cem kochendes

Wasser zusetzen → in kochendem Wasserbad 1, 2, 3, 5 bzw. 10 Minuten belassen → sofort mit Eiswasser abkühlen → Ersetzen des verdampften Wassers (durch Abwägen) → im Mörser Zusatz von Seesand sowie 10a cem 4%iger Metaphosphorsäure und 8a cem Wasser → zerreiben → zentrifugieren → photometrieren. Kontrollversuch wurde ohne Erhitzen, direkt nach Zusatz der Metaphosphorsäure behandelt.

TABELLE III.

Kochdauer (Minuten)	Cysteingehalt (mg%)
1	48,0
2	14,3
3	13,5
5	12,0
10	10,5
Kontrolle	13,5

Wie aus Tabelle III ersichtlich, wird das hydrolysierende Ferment durch 3 Minuten Kochen praktisch vollständig vernichtet. Unter dieser Bedingung fand ich die zugesetzte Menge Glutathion zu Leber und Niere vollständig wieder und konnte fast keine Cysteinentstehung aus zugesetztem Glutathion nachweisen.

3. Einfluss des Kochens auf die Oxydation des Glutathions durch Hämoglobin.

Versuch 4. Zu 2,0 cem Kaninchenblut wird 1,0 cem Wasser bzw. 105 mg%iger wässriger Glutathionlösung zugesetzt → 3 Minuten in kochendem Wasserbad belassen → abkühlen → ersetzen des verdampften Wasser → im Mörser mit Seesand nach Zusatz von 1 cem 20%iger Metaphosphorsäure und 6,0 cem Wasser zerreiben → zentrifugieren → Glutathionbestimmung. Als Kontrollversuch wurde der Glutathiongehalt ohne Erhitzen, aber mit CO-Behandlung bestimmt.

Aus Tabelle IV ersieht man, dass das Glutathion im Blut nach 3 Minuten Kochen grösstenteils (ca. 60%) oxydiert und

als Gesamtglutathion praktisch vollkommen wiedergefunden wird. Zur Bestimmung des Glutathions in blutreichen Geweben darf man daher zum Zweck der Ausschaltung der Fermentwirkung nicht kochen, sondern man muss gefrieren.

TABELLE IV.

	Glutathiongehalt (mg%)	
	reduziert	insgesamt
GSH-Zusatz	30,5	102,3
Ohne Zusatz	12,0 (39%)	49,8 (95%)
Differenz	18,5	52,5
Berechnet	52,5	52,5
% gefunden	35	100
Kontrolle	30,6	52,5

4. Glutathiongehalte der blut- bzw. hämoglobinreichen Organe.

Versuch 5. Ein Mörser aus Hartglas wird vorher mit festem CO₂ genügend abgekühlt. Man bringt ein gefrorenes und abgewogenes Gewebestück (2a g) hinein, dazu eine kleine Menge Seesand. Man setzt abgekühltes Wasser dazu und unter Abkühlen zerreibt man das Gewebe. Man führt es quantitativ mit abgekühltem Wasser in den Hauptraum des modifizierten Thunberg-Gefäßes über und füllt mit Wasser auf 9a cem auf. Man versetzt dies mit einem kleinen Tropfen Oktylalkohol. In den Anhang wird a cem 20%ige Metaphosphorsäure gebracht und nach Sättigen der Flüssigkeit mit CO wird das Gefäß geschlossen. Nach Einkippen der Metaphosphorsäure wird die Flüssigkeit gut gemischt und geschüttelt. Nach 15 Minuten oder mehr wird die Flüssigkeit zentrifugiert. Man setzt dem Filtrat ein gleiches Volumen 2%ige Metaphosphorsäure zu und photometriert (Vgl. Fujita, Ebihara u. Numata, 1939). Zum Vergleich wurde ein Teil des gefrorenen Gewebes direkt nach Zusatz der Metaphosphorsäure zerrieben, zentrifugiert und gemessen (In Tabelle V werden solche Werte eingeklammert bezeichnet). Die Glutathiongehalte in Tabelle V

TABELLE V.

Art des Tieres	Gewebe	Glutathiongehalt (mg%)			Cysteingehalt (mg%)		
		reduziert	insgesamt	red. insges. (%)	reduziert	insgesamt	red. insges. (%)
Meerschweinchen	Lunge	86,1 (83,1)	97,0 (101,8)	89 (87)	3,0 (3,0)	3,0 (3,0)	100 (100)
	Herz	106,0 (96,0)	115,0 (109,8)	92 (88)	1,1 (1,5)	3,8 (3,8)	29 (40)
Kaninchen	Knochenmark	84,0 (80)	120,1 (120,1)	70 (67)	3,0 (3,0)	7,5 (6,8)	40 (44)
	Milz	235,0 (220)	256,0 (261,0)	92 (84)	7,9 (7,9)	12,0 (10,5)	66 (75)
	Skelettmuskel	42,0 (44,0)	73,2 (67,9)	57 (65)	1,5 (1,1)	2,3 (2,3)	65 (49)
Katsuwonus vagans ("Katsuo")	Dunkelroter Muskel	10,5 (10,5)	38,8 (38,8)	27 (27)	1,5 (1,9)	3,8 (3,8)	40 (50)
	Roter Muskel	4,2 (4,2)	19,4 (19,4)	22 (22)	0,8 (0,8)	1,5 (1,5)	53 (53)
Thunnus orientalis ("Maguro")	Dunkelroter Muskel	12,0 (12,0)	44,0 (44,0)	27 (27)	0,8 (0,8)	2,3 (2,3)	35 (35)
	Roter Muskel	4,0 (4,0)	38,5 (44,0)	10 (9)	0,8 (0,4)	4,5 (4,5)	18 (9)
Mensch	Placenta	31,4 (27,2)	32,5 (32,5)	97 (84)	5,6 (5,3)	6,0 (6,0)	93 (88)

wurden bezüglich des vorliegenden Cysteins nicht korrigiert.

Wie aus Tabelle V ersichtlich, sind die gemessenen Werte nach Gefrieren und CO-Behandlung nur bei Herz, Milz und Placenta deutlich grösser als sonst. Die Oxydation des Glutathions durch Hämoglobin ist also nur bei der Messung der genannten Gewebe bemerkbar. Die sonstigen Gewebe zeigten praktisch keinen bemerkbaren Einfluss, also ist die CO-Behandlung bei vielen Geweben überflüssig. Der Vergleich der Cysteingehalte nach der neuen und alten Methode zeigt eindeutig, dass die beiden Werte praktisch vollkommen übereinstimmen, also findet fast keine Hydrolyse des Glutathions durch die beschriebene Behandlung statt.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Glutathion im Gewebe wird nach dem Töten des Tiers fermentativ hydrolysiert und es entsteht freies Cystein. Die

Hydrolyse ist nach der Zerstörung der Gewebe besonders auffallend.

2. Die Hydrolyse des Glutathions geschieht nach 5 Minuten Erwärmen bei 70°C noch deutlich, während sie nach 5 Minuten bei 90°C fast völlig aufgehoben wird. Bei 100°C wird die Wirkung innerhalb von 3 Minuten praktisch vollkommen aufgehoben.

3. Durch 3 Minuten Kochen des Blutes wird das Glutathion grösstenteils oxydiert.

4. Um die fermentative Hydrolyse des Glutathions und die Oxydation des Glutathions durch Hämoglobin bei der Enteiweissung gleichzeitig zu verhüten, ist das Gewebe in der Kälte zu behandeln und im CO mit Säure zu enteiweissen. Unter der genannten Bedingung wurden die Glutathiongehalte der verschiedenen blut- bzw. hämoglobinreichen Gewebe gemessen und die Werte mit denen der mit Säure direkt enteiweissten verglichen. Der Einfluss des Hämoglobins wurde nur bei Herz, Milz und Placenta beobachtet, während sonst viele Gewebe praktisch unbeeinflusst geblieben waren. Durch die genannte Behandlung wurde fast keine Hydrolyse des Glutathions nachgewiesen.

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Dr. A. Fujita ausgeführt, welchem ich an dieser Stelle bestens danke.

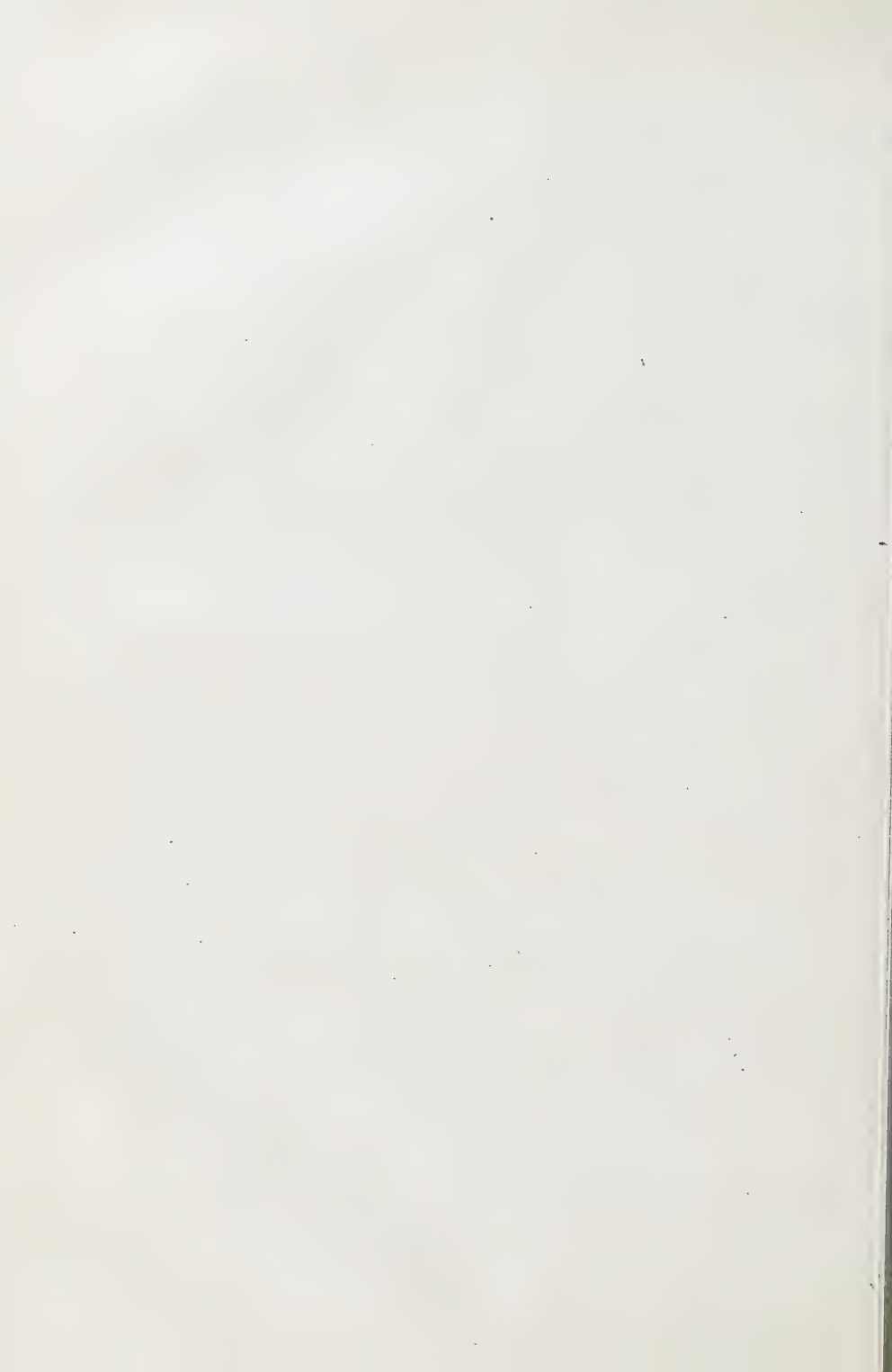
LITERATUR.

Fujita, Ebihara u. Numata (1939): Bioch. Z., 301, 245.

Fujita u. Iwatake (1935): Bioch. Z., 277, 284.

Fujita u. Numata (1939): Bioch. Z., 300, 264.

Numata (1939): Tokyo Ijishinshi, 3154, 7.



COLOUR REACTIONS OF ANTHROPO-DESOXY- CHOLIC ACID, THEIR SPECIFICITY, AND THEIR APPLICABILITY TO THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE ACID.

(The 11th report on the colour reaction of bile acids.)

By

GEORGE SABA.

(From the Biochemical Laboratory of the "Nippon" Medical School, Tokyo.
Director: Prof. Dr. K. Kazi-ro.)

(Received for publication, October 11, 1939)

Ohyama and Nagaki(1939) have recently made the interesting finding that human bile contains much more anthropo-desoxycholic acid than was generally accepted since the study of Wieland and Revere (1924). This gave more significance to the establishment of a practical determination method for the acid in the course of clinical investigation of bile samples.

From this point of view, an attempt was made by Ohyama (1939) to establish a determination method based on the "delayed reaction" of the acid in Kazi-ro-Shimada's Benzaldehyde test (1938), which was later modified somewhat by Saba (1939). The result was, however, not satisfactory.

This colour reaction of anthropo-desoxycholic acid, although it is the only noted reaction of the acid, revealed a weak point in application to colorimetric determination of the acid, i.e.,

- 1) the colour reaction is very much delayed after the treatment of the colour development. (7-8 hrs. at least), and
- 2) the colour reaction is greatly influenced by the coexistence of other bile acids, which limits the application of the reaction to the colorimetric determination of the acid.

But in an extended series of our experiments in which various kinds of aromatic aldehydes were used as a coupling reagent, it was seen that a higher specificity of colour reaction for the acid can be

attained by selecting the proper aldehyde and the mode of colour development, with the aid of sulfuric or phosphoric acid and glacial acetic acid, as was proposed in the original procedure.

The result of the investigations follows:

A. SERIES OF SPECIFIC COLOUR REACTIONS FOR ANTHROPO-
DESOXYCHOLIC ACID.

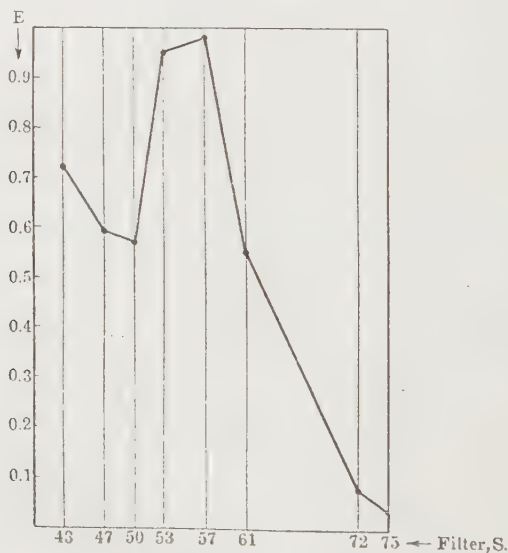
I. Test with *p*-dimethylamino-benzaldehyde and
sulfuric acid.

Reagents. First prepare 75% sulfuric acid, and dissolve *p*-dimethylamino-benzaldehyde into it to make a 10% solution of the latter.

Mode of colour development. Put a small quantity of the test material in a test tube, add 1 cc. of the reagent, and heat the solution in a water bath at 50°C for 5 minutes. Then cool the test tube in running water for about 1 minute and add 5 cc. of

Fig. 1.

1.0 mg anthrope-desoxycholic acid, Pulfrich's photometer, 10 mm cuvette.



glacial acetic-acid. If anthro-po-desoxycholic acid is present, a beautiful violet colour, which is very stable and lasts for more than 20 hours, is instantly obtained. The typical colour reaction of anthro-po-desoxycholic acid is presented as an extinction curve in Figure 1.

The specificity of the reaction. The specificity of the reaction is very high, i.e., anthro-po-desoxycholic acid is the only one which gives a positive reaction among the common bile acids. (see Table I).

TABLE I.

Anthro-po-desoxycholic acid	violet.
Hyo-desoxycholic acid	yellow.
Cholic acid	yellow.
Desoxycholic acid	brown.
Dehydrocholic acid	yellow.
Amyl-alcohol	violet.
Cholesterol	violet.
Blank	colourless.

(N.B.) When phosphoric acid is used in the place of sulfuric acid, no specific colour can be obtained for anthro-po-desoxycholic acid, as showed in Table II.

TABLE II.

Anthro-po-desoxycholic acid	green.
Hyo-desoxycholic acid	grass green
Cholic acid	grass green
Desoxycholic acid	grass green
Dehydrocholic acid	grass green
Blank	yellow.

II. Test with vanilline and sulfuric acid.

Reagents. 1. 75% sulfuric acid.

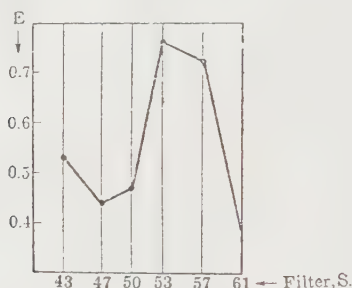
2. 5 g/dl alcoholic solution of pure vanilline.

Mode of colour development. To the test material in a test

tube, add 1 drop of vanilline solution and 2 cc. of 75% sulfuric acid, heat the test tube in a water bath at 50°C for 5 minutes. After cooling the test tube in running water for about 1 minute, add 5 cc. of glacial acetic acid. The colour reaction of anthrope-desoxycholic acid is a delicate violet (Figure 2).

Fig. 2.

1.0 mg anthrope-desoxycholic acid, 10 mm cuvette.



The specificity of the reaction. This is given in Table III.

TABLE III.

Anthrope-desoxycholic acid	violet.
Hyo-desoxycholic acid	brown.
Cholic acid	amber.
Desoxycholic acid	violet at first, fades to amber in 5 minutes.
Dehydro-cholic acid	yellow.
Amyl-alcohol	reddish brown.
Cholesterol	violet.
Blank	colourless.

III. Test with vanilline and phosphoric acid.

Reagents. 1. 5 g/dl alcoholic solution of pure vanilline.

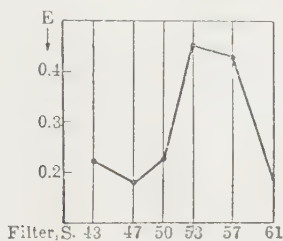
2. Phosphoric acid, ordinary commercial (90%).

Mode of colour development. This is carried out in the same manner as in 2. The heating of the solution is 100°C for 5 minutes.

The colour-reaction of anthropo-desoxycholic acid is violet as shown in Fig. 3.

Fig. 3.

1.0 mg anthropo-desoxycholic acid, 10 mm cuvette.



Specificity of the reaction. (Table IV).

TABLE IV.

Anthropo-desoxycholic acid	violet.
Hyo-desoxycholic acid	violet.
Cholic acid	amber.
Desoxycholic acid	yellow.
Dehydrocholic acid	yellow.
Amyl-alcohol	yellow.
Cholesterol	faint violet.
Blank	colourless.

IV. Test with salicyl-aldehyde and sulfuric acid.

Reagents. 1. Pure salicyl-aldehyde.

2. 75% sulfuric acid.

Mode of colour development. Put a small quantity of the test material in a test tube, add 2 cc. of 75% sulfuric acid and one drop of salicyl-aldehyde and heat the solution in a water bath at 50°C for 10 minutes. Then cool the test tube in running water for about 1 minute, and add 5 cc. of glacial acetic acid. Examine the result 10 minutes later. The colour reaction of anthropo-desoxycholic acid is a pretty reddish purple shown in Fig. 4 as an extinction curve.

Fig. 4.

1.0 mg anthro-po-desoxycholic acid, 10 mm cuvette.

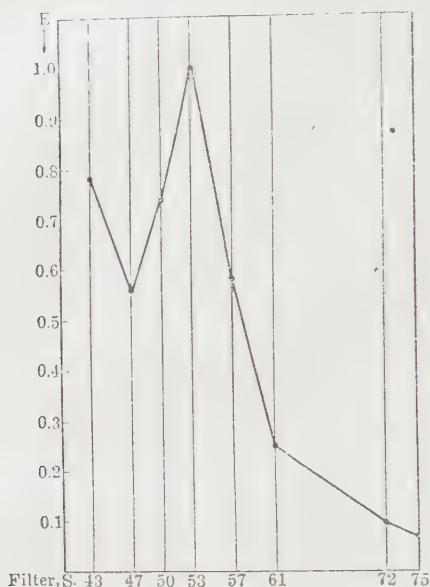
*Specificity of the reaction. (Table V).*

TABLE V.

Anthro-po-desoxycholic acid	reddish purple.
Hyo-desoxycholic acid	reddish purple.
Cholic acid	yellow.
Desoxycholic acid	grass green.
Dehydrocholic acid	faintly purple.
Amyl-alcohol	violet.
Cholesterol	weak reddish purple.
Blank	faintly purple.

*V. Test with salicyl-aldehyde and phosphoric acid.**Reagents.* 1. Pure salicyl aldehyde.

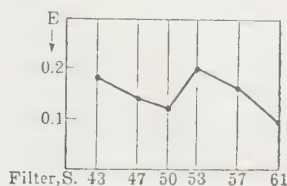
2. Phosphoric acid. Ordinary commercial (90%).

Mode of colour development. Same as 4. The heating in this

case is 50°C, 10 minutes. The colour curve of anthro-po-desoxycholic acid is showed in Fig. 5.

Fig. 5.

1.0 mg anthro-po-desoxycholic acid, Pulfrich's photometer,
10 mm cuvette.



Specificity of the reaction. (Table VI).

TABLE VI.

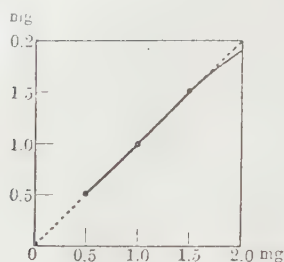
Anthro-po-desoxycholic acid	violet.
Hyo-desoxycholic acid	violet.
Cholic acid	yellow.
Desoxycholic acid	yellow.
Dehydrocholic acid	yellow.
Blank	colourless.

B. APPLICATION OF THE TEST METHODS TO THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTHROPO-DESOXYCHOLIC ACID.

The author has outlined in the previous article a series of test methods, by which anthro-po-desoxycholic acid reveals a different colour reaction from other bile acids. As each of these test methods, especially the *p*-dimethylamino-benzaldehyde test, gives a specific colour reaction to anthro-po-desoxycholic acid, it is easily seen that these test methods are applicable to the qualitative differentiation of the acid from other bile acids. It is simultaneously noted that the colour strength of the reaction of anthro-po-desoxycholic acid in these test methods is in direct proportion to the amount of the acid. As an example, Figure 6 is demonstrated as showing that anthro-po-desoxycholic acid is colorimetrically reformed by Beer's law in *p*-dimethylamino-benzaldehyde test.

Fig. 6.

Found.



Added.

This fact indicates that the test method is also applicable to the quantitative estimation of the acid, i.e., the latter can be determined by simple colorimetry, in which the colour strength of the reaction of the pure acid of known quantity, is taken as the standard.

This relation is, however, very different when other bile acids (cholic or desoxycholic acid) coexist with anthro-po-desoxycholic acid. The colour reaction of anthro-po-desoxycholic acid is highly interfered with by those of other bile acids, especially of

TABLE VII.

Added		Found	Errors %
Anthro-po-desoxycholic	Cholic	Anthro-po-desoxycholic	
1.0 mg	1.0 mg	1.0 mg	0
1.0	2.0	1.0	0
1.0	3.0	1.0	0
1.0	4.0	1.0	0
1.0	5.0	1.0	0
	Desoxy- cholic		
1.0	1.0	1.25	25
1.0	2.0	1.43	43
1.0	3.0	1.60	60
1.0	4.0	1.76	76
1.0	5.0	1.91	91

desoxycholic acid. Practically stated, this contamination of the colour reaction of anthro-po-desoxycholic acid is the least in the case of the *p*-dimethylamino-benzaldehyde test; but even in this case, the coexistence of desoxycholic acid results, more or less, in significant errors, in estimating the value of anthro-po-desoxycholic acid. The influence of desoxycholic acid and cholic acid on the value of anthro-po-desoxycholic acid was studied as follows (Table VII).

This table shows that cholic acid does not influence the value of anthro-po-desoxycholic acid, in spite of the colour-contamination of the latter; but on the other hand, desoxycholic acid makes an error of about 25% in the value of anthro-po-desoxycholic acid, even when the former is added in the same quantity as the latter.

Concerning this result, the author can not claim the methods are satisfactory, but simultaneously it must be emphasized here that there has been as yet no better method for determination of the acid.

As noted above, Ohyama (1939) recently reported on the Benzaldehyde-test, which is based on the "delayed reaction" of

TABLE VIII.

Added		Found	Errors %
Anthro-po-desoxycholic	Cholic	Anthro-po-desoxycholic	
1.0 mg	0.25 mg	1.094 mg	9.4
1.0	0.5	1.189	18.9
1.0	0.75	1.258	25.8
1.0	1.0	1.436	43.6
1.0	1.5	1.584	58.4
	Desoxy- cholic		
1.0	0.25	1.152	15.2
1.0	0.5	1.307	30.7
1.0	0.75	1.407	40.7
1.0	1.0	1.594	59.4
1.0	1.5	1.841	84.1

(Ohyama)

anthropo-desoxycholic acid to benzaldehyde and sulfuric acid (Kaziro, Shimada and Saba), but the error of the determined value of anthropo-desoxycholic acid by his method by the co-existence of cholic or desoxycholic acid is apparently greater than by my methods. (Table VIII).

In any case, these test methods are more safely applied in the determination of anthropo-desoxycholic acid, when the main part of the cholic or desoxycholic acid is removed from the test material. On this principle, the test methods are most accurately applicable to the bile in which anthropo-desoxycholic acid predominates, i.e., fowl bile or some human biles, are the most favourable for analysis by these methods.

An example showing the application of the *p*-dimethylamino-benzaldehyde test to estimate the anthropo-desoxycholic acid in human bile, is demonstrated in the following chart. The found amount of the acid is compared with the calculated rate from the total sum of whole bile acids (cholic, desoxycholic and anthropo-desoxycholic acid) determined by means of the Vanilline-phosphoric acid method of Abe (1937) and by Shimada's furfural method.

ANALYSIS.

Material: Bile from Y.N. male, 63 yrs. old, operated on for gall calculi. Before colorimetry, the specimen was shaken with petroleum-ether to remove neutral fat and cholesterol.

Estimated bile acid in/cc Bile.	Found amounts
Cholic acid (Shimada's furfural method)	2.15 mg
Desoxycholic acid (Benzaldehyde method)	not found.
Anthropo-desoxycholic acid (<i>p</i> -dimethylaminobenzaldehyde method)	8.0 mg
	Total, 10.15 mg
Cholic + desoxycholic + anthropo. (Abe's method)*	10.9 mg

* The vanilline method was first described by Abe as a determination method of the total amount of cholic and desoxycholic acid, but it was recently remarked by Nagaki (1939), that the value of this method represents the sum of cholic, desoxycholic and anthropo-desoxycholic acid.

As is well known, Wieland and Reverey (1924) found that the ratio of the amount of cholic, desoxycholic, and anthropo-desoxycholic acid is about 3:1:1 in human bile. But anthropo-desoxycholic acid is often found to predominate in human bile acids, as was recently reported by Nagaki and Ohyama (1939). The above analysis corresponds to the former findings of these authors, showing that anthropo-desoxycholic acid exists apparently in greater quantity than cholic or desoxycholic acid in this analyzed bile.

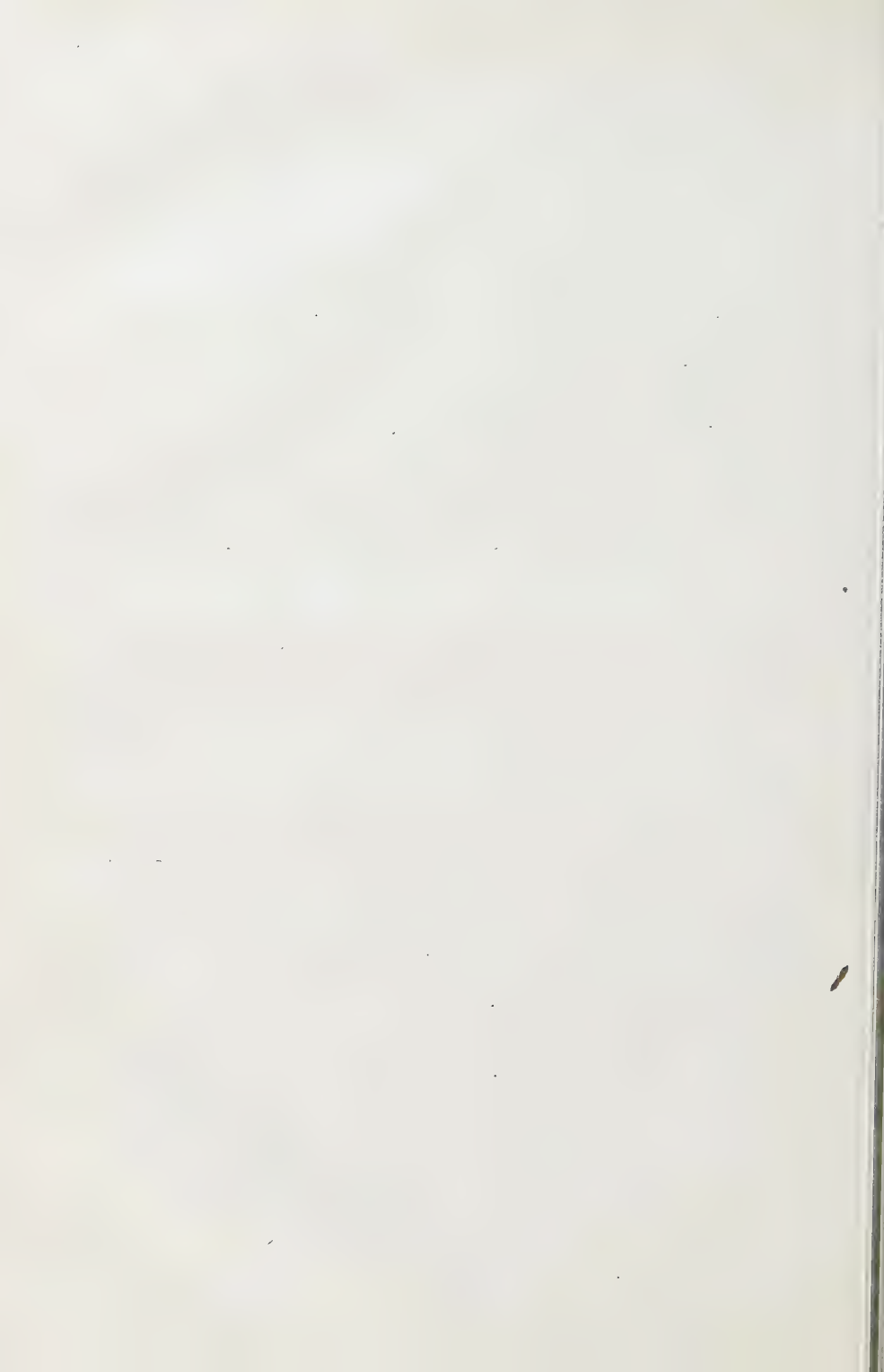
SUMMARY.

1. A series of test methods by which anthropo-desoxycholic acid reveals a specific colour reaction from other bile acids was described.
2. The applicable limits of these test methods to the qualitative and quantitative determination of anthropo-desoxycholic acid were studied.

REFERENCES.

- Abe, Y. (1937): *Jl. of Biochem.*, 25, 181.
 Kaziro, K. and T. Shimada (1937 i): *Z. f. physiol. Chem.*, 249, 220.
 Kaziro, K. and T. Shimada (1938 iv): *Z. f. physiol. Chem.*, 251, 57.
 Nagaki, T. (1939): *Nippon-Shokakibyogakkai-Zasshi.*, 38, 245.
 Ohyama, Y. (1938 ii): *Jl. of biochem.*, 27, 351.
 Ohyama, Y. (1939 x): *Nihon. Ika. Daig. Z.*, 10, 1547.
 Saba, G. (1939 viii): *Jl. of Biochem.*, 29, 371.
 Saba, G. (1939 ix): *Jl. of Biochem.*, 30, 61.
 Shimada, T. (1938 iii): *Jl. of Biochem.*, 28, 149.
 Shimada, T. (1938 v): *Jl. of Biochem.*, 28, 169.
 Shimada, T. (1938 vi): *Nihon Ika Daig. Z.*, 9, 1321.
 Shimada, T. (1939 vii): *Jl. of Biochem.*, 29, 41.
 Wieland, H. and G. Reverey (1924): *Z. f. physiol. Chem.*, 140, 186.

The Roman letters show the number of our works on the colour reaction of bile acids, and this paper corresponds to the 11th report on this subject.



ÜBER DIE MIKROBESTIMMUNGSMETHODE VON LIPOID-AMINO-N IM BLUT DES HUNDES.

VON

SEKISEN KAN.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1939.)

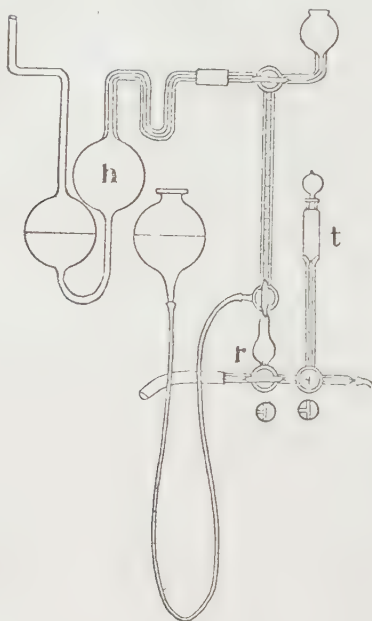
Die Van Slyke'sche Methode, eine bisher zur Amino-N-Bestimmung am meisten gebräuchliche Methode, ergibt beim Blindversuch jedesmal 0,2–0,3 ccm Gas, was alles freilich zur Mikrobestimmung ungeeignet ist. Nakashima (1932) konstruierte also einen Apparat, eine Modifizierung der Van Slyke'schen Methode (Fig. 1), und konnte an verschiedenen Aminosäure-Lösungen eine geringe Menge von Amino-N mit gutem Erfolg bestimmen. Die durch seine Methode gewonnene N-Menge beträgt im Vergleich mit derjenigen, die durch die Kjeldahl'sche Methode gewonnen wird, durchschnittlich um 1,0% mehr.

Die kurze Darstellung dieser Methode folgt hier in grossen Auszügen: man giesst zuerst das Versuchsobjekt in einen Reaktionskolben, führt die Luft durch Zuleitung von CO₂ ab, zersetzt Aminosäure durch Einwirkung des ebenfalls durch CO₂ entlüfteten Reagens, Eisessigsäure und Natriumnitritlösung, lässt NO und CO₂ im isolierten Stickstoffgas vermisch, in die alkalische Permanganatlösung resorbiören und versetzt das zurückgelassene Stickstoffgas in das Eudiometer, um seine Menge zu bestimmen, woraus man die Menge von Amino-N rechnerisch ermittelt.

Dann möchte ich die Handhabung dieses Apparates auszugsweise darstellen. Man tut 1.0 ccm Aminosäure-Lösung in t hinein, lässt sie in den Reaktionskolben r einfließen, wäscht t mit 1 ccm Eisessigsäure und 2 ccm Wasser, lässt es auch zusammen in den Reaktionskolben hineinfließen, füllt t mit 2 ccm Natriumnitritlösung, leitet in t und r Kohlensäuregas 1 Minute lang, um die in Reagens und Versuchsobjekten enthaltene Luft hinauszutreiben, vermischt Natriumnitritlösung in t mit Versuchsobjekten unter Zuflussung in den Reaktionskolben, schüttelt nach 3 minutigem Aufenthalt 1 Minute lang stark, leitet das daraus entstandene Gas in eine alkalische Permanganatlösung enthaltende Resorptionskugel, führt nach 1 minutigem

Schütteln wieder in das Eudiometer zurück, misst das Volumen des Stickstoffgases ab und ermittelt aus Lufttemperatur und Luftdruck rechnerisch die Menge von Amino N. Als Reagenzien braucht man 1) Eisessigsäure, 2) 30 g/dl Natriumnitritlösung, 3) 20% Salzsäure, 4) Marmor (den man in fingerkuppengrosse Stücke schlägt, im Wasser 1–2 Stunden lang kocht, um die darin enthaltene Luft möglichst zu beseitigen und bewahrt im Wasser auf), 5) Lösung von 50 g KMnO_4 und 25 g KOH in 1000 ccm Wasser.

Fig. 1.



Takata (1936) konnte bei seiner Untersuchung über "Umsatz der Fettstoffe in dem Nervengewebe der Taube bei der B-Avitaminose" die Menge von Lipoid- $\text{NH}_2\text{-N}$ im Gewebe bestimmen.

Bei meiner Untersuchung über den Umsatz des Phosphatides (Kan, 1940: "Einflüsse der Injektion des hämolysierten Blutes auf Phosphatide im Blut der Vena lienalis und der peripheren Blutgefäße") konnte ich durch die Lipoid- $\text{NH}_2\text{-N}$ Bestimmungsmethode, die Takata (1936) als Anwendung der Nakashima'schen Methode (1932) benutzte, die Menge von Lipoid- $\text{NH}_2\text{-N}$ im Blut des Hundes bestimmen. Nämlich man extrahiert 2,0 ccm Vollblut der Arteria

femoralis des Hundes, das vor Gerinnung durch Kaliumoxalat geschützt ist, vermischt mit 40 ccm Alkohol und Äther von gleichen Teilen, filtriert es in den Mikrokjeldahlkolben, verdampft es unter Minderdruck, löst den Rückstand in Reinäther, filtriert ihn durch Asbestfilter ins Sedimentrohr, verdampft den Äther auf dem Wasserbad, fügt zum Rückstand 0,5 ccm Alkohol, löst ihn durch Erwärmung, bereitet durch Zufügung von 2 ccm warmem Wasser die Emulsion und verdampft sie auf 1 ccm, um den Alkohol vollständig auszutreiben. Man tut 1 ccm dieses Versuchsobjektes in den Reaktionskolben (r in Fig. 1) mit 1 ccm Eisessigsäure und 20 gtt. Amylalkohol (ca. 0,4 ccm, zwecks Herabsetzung der Schaumbildung) hinein, tut in t (Fig. 1) 2 ccm von 30% Natriumnitritlösung hinein, leitet einzeln in t und r Kohlensäuregas 1 Minute lang, lässt die Natriumnitritlösung aus t in den Reaktionskolben zufließen, schüttelt den Kolben nach Vermischung mit dem Versuchsobjekt 5 Minuten lang und schüttelt die Resorptionskugel 3 Minuten lang.

Nun kommt die Frage, wieviel ccm Vollblut dabei am geeignetsten ist. Da Takata (1936) mit 1,0 ccm Blut die Bestimmung nicht ausführen konnte, so versuchte ich die Bestimmung, wie Tabelle I zeigt, mit 1,0, 2,0 und 3,0 ccm desselben Blutes. Beim Gebrauch von 1,0 ccm war das Volumen des Stickstoffgases allzu gering. Da ich erkannte, dass man nach der Ergebnissen beim Gebrauch von 2,0 ccm und 3,0 ccm mit 2,0 ccm Blut schon sicher genug bestimmen kann, so bestimmte ich, 2,0 ccm Blut gebrauchend, den Lipoid-NH₂-N in demselben. (Tabelle Ia).

Zunächst prüfte ich, ob die Schüttelungsdauer im Reaktionskolben mit 5 Minuten genug ist, indem ich bei Kaninchenblut 2,0 ccm und 3,0 ccm je um 5- und 8 Minuten lang schüttelte. Nach diesen Ergebnissen war die Schüttelungsdauer für je 2,0 ccm und 3,0 ccm mit 5 Minuten genug. (Tab. Ib).

Dann bestimmte ich nach der Methode NH₂-N in Glykokoll (das man bei 97°C 4 Stunden lang trocknet, bis sein Gewicht stabilisiert ist), und prüfte NH₂-N in Glykokolllösung unter Zusetzung der Vollblutfettstoffemulsion des Hundes mit bekannter Menge von NH₂-N und gelangte zu Ergebnissen wie in Tabelle II

TABELLE I a.

Hund-Nr.	Blutmenge ccm	Gasmenge		Amino-Stickstoff mg	Temperatur	Luftdruck
		Blind-versuch ccm	Gefunden ccm			
17(♀)	1	0,03	0,055	0,0139	25°	760 mm
"	2	"	0,08	0,0278	"	
"	1	0,025	0,05	0,0143	21°	
"	2	"	0,075	0,0282	23°	
"	3	"	0,105	0,0451	"	
18(♂)	1	"	0,055	0,0169	"	
"	2	"	0,09	0,0366	"	
"	3	"	0,10	0,0423	"	
19(♂)	1	"	0,065	0,0223	24°	
"	3	"	0,130	0,0586	"	

TABELLE I b.

Blutmenge ccm	Zeitdauer der Schüttelung Min.	Gasmenge		Amino-Stickstoff mg	bei 22° u. 762 mm Luftdruck
		Blind-versuch ccm	Gefunden ccm		
3	5	0,03	0,23	0,1130	bei 22° u. 762 mm Luftdruck
3	8	"	"	"	
2	5	"	0,16	0,0735	
2	8	"	"	"	

angegeben.

Zunächst zeige ich in Tabelle III Ergebnisse in 10 Fällen normaler Hunde. Nach diesen Resultates ist der höchste Wert des Lipoid-NH₂-N 2,26 mg/dl, der niedrigste 0,70 mg/dl, durchschnittlich 1,60 mg/dl. Zugleich wurde die Menge des Lipoid-Phosphors in 5 Fällen darunter bestimmt, die hier gezeigt ist.

Wie obige experimentelle Ergebnisse zeigten, konnte ich mittels der Takata'schen Lipoid-NH₂-N-Methode (1936), einer Modifizierung der Nakashima'schen Mikrobestimmungsmethode (1932), eine geringe Menge von Lipoid-Amino-N im Blut des Hundes auf einfache Weise schnell und genau bestimmen.

TABELLE II.

Material	Amino- Stickstoff (berechnet) mg	Gasmenge		Amino- Stickstoff (gefunden)		bei 20° u. 764 mm Luftdruck
		Blind- versuch ccm	Gefunden ccm	mg	%	
Glykokoll 0,1885 mg	0,035	0,03	0,09	0,034	97	
"	"	"	"	"	"	
Hund (A) Vollblut 2,0 ccm		"	0,12	0,052		
Hund (A) Vollblut 2,0 ccm + Glykokoll 0,1885	0,035 + 0,052 = 0,087	"	0,17	0,080	92	
Hund (B) Vollblut 2,0 ccm		"	0,07	0,023		
Hund (B) Vollblut 2,0 ccm + Glykokoll 0,1885	0,035 + 0,023 = 0,058	"	0,12	0,052	90	

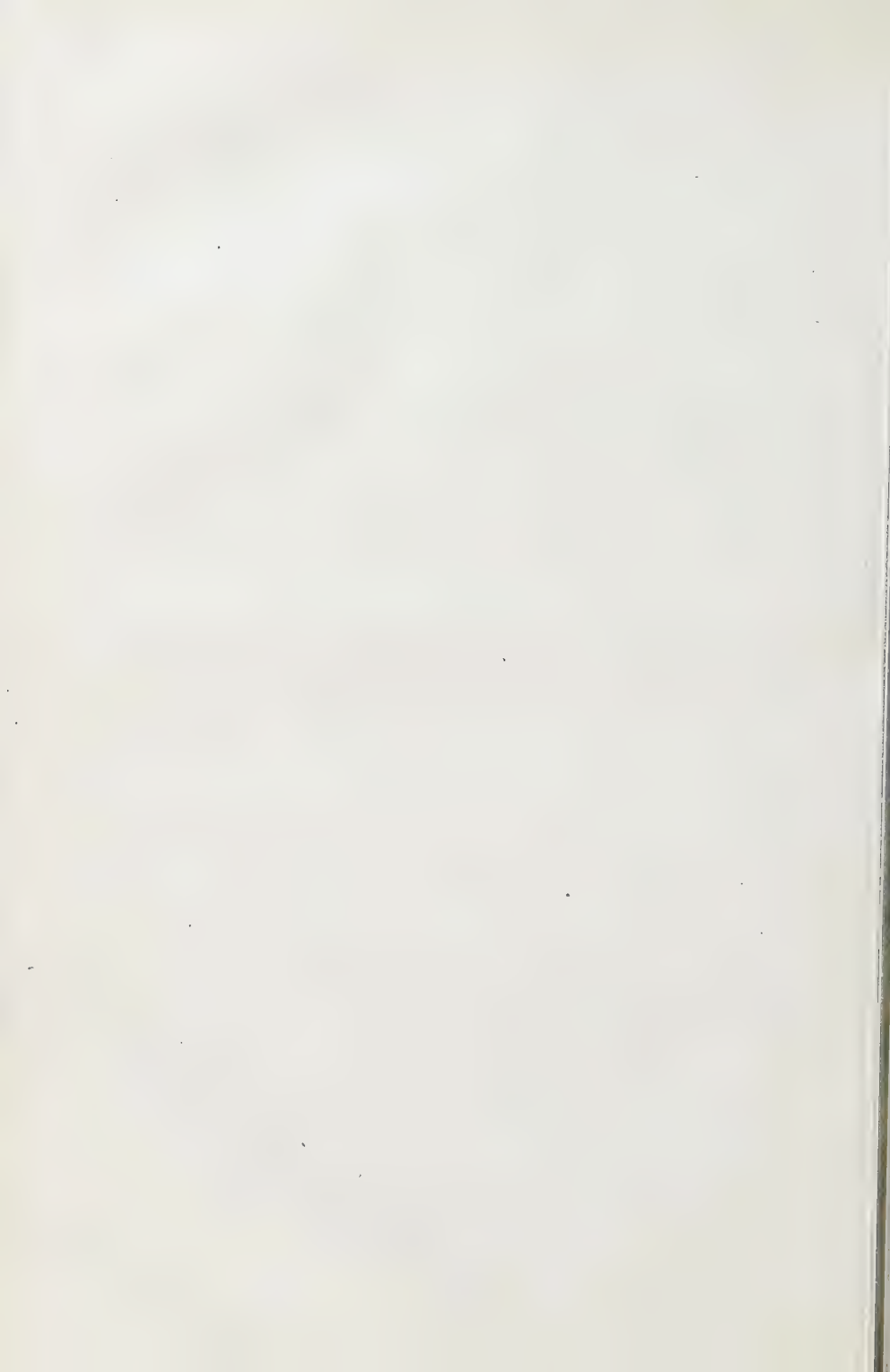
TABELLE III.

Versuch	Hund- Nr.	Körper- gew. Kg	Amino- Stickstoff mg	Lipoid- Phosphor mg
1	17 (♀)	9,2	0,0278	
2	18 (♂)	9,0	0,0366	
3	19 (♂)	6,8	0,0446	
4	20 (♀)	8,1	0,0334	
5	47 (♀)	5,0	0,0224	
6	48 (♀)	6,0	0,0252	0,1826
7	51 (♂)	4,4	0,0140	0,1636
8	52 (♀)	6,4	0,0368	0,1912
9	53 (♀)	5,9	0,0340	0,1966
10	55 (♂)	6,9	0,0452	0,1874

Lipoid-NH₂-N im Vollblut d. norm. Hundes (mg/dl) 1.60

LITERATUR.

- Kan (1940): J. Biochem., 31, 61.
 Nakashima (1932): J. of Jûzen Med. Soc., 57, 2176.
 Takata (1936): J. Biochem., 24, 167, 261.



UNTERSUCHUNG ÜBER DEN PHOSPHATIDUMSATZ.

Einflüsse der Injektion des hämolysierten Blutes auf
Phosphatide im Blut der Vena lienalis und der
peripheren Blutgefäße.

Von

SEKISEN KAN.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 18. Oktober 1939.)

In zwei vorhergehenden Mitteilungen [Kan (1938/1939)] habe ich festgestellt, dass bei normalen Hunden die intravenöse Injektion des hämolysierten Blutes eine bedeutende Vermehrung des Lipoid-P im Vollblut, aber bei entmilzten Hunden eine Verminderung desselben hervorruft, und dass die Injektion des Hämoglobins, eines Bestandteils vom hämolysierten Blut, ebenfalls eine Vermehrung des Lipoid-P im Vollblut hervorruft wie die Injektion des hämolysierten Blutes selbst, woraus ich folgerte, dass zwischen Hämoglobinumsatz und Phosphatidumsatz in der Milz ein wesentlicher Zusammenhang bestehen muss.

Nun habe ich aber die Absicht, zu untersuchen, ob die Vermehrung des Lipoid-P im Blut vom direkten Einfluss der Milz her stammt, indem ich normalen Hunden in die Arteria lienalis hämolysiertes Blut injiziere, dann das Blut aus der Vena lienalis entnehme und den Lipoid-P im Vollblut bestimme, und zu prüfen, auf welcher Substanz die durch Injektion des hämolysierten Blutes hervorgerufene Vermehrung des Blutphosphatides beruht, indem ich in die Ohrvene des Hundes hämolysiertes Blut injiziere, dann das Blut der Femoralarterie entnehme und die Menge des Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N im Vollblut bestimme.

EXPERIMENT.

I. Versuchsmethode.

Die Herstellung des hämolysierten Blutes wird folgendermaßen vorgenommen: man stellt aus dem aus A. femoralis entnommenen Blut eines normalen Hundes Zitratplasma her, isoliert die Blutkörperchen, wäscht diese 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung, fügt doppelt so viel Wasser wie die Blutkörperchenmenge hinzu, um das Blut zu hämolysieren, und fügt dann Kochsalz in Mengen von 0,85% hinzu.

Zur Prüfung des Phosphors im Vollblutlipoid entnimmt man das Blut aus der Arteria femoralis vor der Injektion, 30 Minuten, anderthalb Stunden, 3, 5, 7, 24, 48 Stunden nach der Injektion, tut je 2,5 ccm davon in ein Spitzglas mit 2 gtt von 25% Kaliumoxalat hinein, bestimmt den Phosphor aus 1,0 ccm Blut zweimal und bestimmt den Durchschnittswert. Zur gleichzeitigen Prüfung des Lipoidphosphors, Lipoid-N und Lipoid-Amino-N im Vollblut entnimmt man aus der Arteria femoralis vor der Injektion, 3, 5, 7, 24, 48 Stunden nach der Injektion jedesmal 5,5 ccm Blut und benutzt 2,0 ccm davon für Lipoidphosphor, 1,0 ccm für Lipoid-N und 2,0 ccm für Lipoid-Amino-N zur Bestimmung dieser Substanzen.

Die Bestimmung des Lipoidphosphors im Blut wird, wie in dem vorigen Versuch, nach Takata'scher Methode (1936) vorgenommen.

Zur Bestimmung des Lipoid-N extrahiert man 1,0 ccm Blut mit einem Gemisch von je 10 ccm Alkohol und Äther, filtriert und verdampft es unter Niederdruck, löst den Rückstand in Reinäther, filtriert in den Mikrokjeldahlkolben, verdampft wieder unter Niederdruck und bestimmt den Stickstoff des Rückstands nach Mikrokjeldahl'scher Methode.

Die Bestimmung des Lipoid-Amino-N wird nach Takata'scher Methode (1936), welche die Nakashimaschen Mikrobestimmungsmethode des Amino-N (1932) anwendete, vorgenommen. Die Behandlung wurde schon in meiner vorigen Mitteilung (Kan, 1910) genau erwähnt, so möchte ich hier nur in kurzen Zügen darüber berichten. Man extrahiert 2,0 ccm Vollblut mit einem Gemisch von je 20 ccm Alkohol und Äther, verdampft es nach Filtration unter Niederdruck, löst den Rückstand in Reinäther, verdampft

den Äther nach Filtration, fügt dem Rückstand 0,5 ccm Alkohol hinzu, stellt die Emulsion durch Hinzufügen von Wasser her, verdampft sie auf 1 ccm, um den Alkohol vollständig zu vertreiben, und bestimmt darin das $\text{NH}_2\text{-N}$ -Gas mittels des Nakashima'schen Apparates.

Als Versuchstiere benutzt man mittelgrosse oder kleine normale Hunde. Das hämolysierte Blut wird dem Tiere in Vena auricularis injiziert.

II. Lipoid-P im Vollblut von Vena lienalis und Arteria femoralis im Falle, dass man dem normalen Hunde das hämolysierte Blut in Arteria lienalis injiziert.

Man injiziert den Tieren das hämolysierten Blut (3 fach verdünnter Lösung der Blutkörperchen) in Arteria lienalis (bei Hund Nr. 85 13 ccm, bei Hund Nr. 86 und 87 15 ccm), vernäht die Bauchwand nur vorläufig, öffnet die Bauchhöhle wieder nach 5 Stunden, entnimmt das Blut aus Vena lienalis und zugleich auch aus Arteria femoralis. Das vorige Experiment beschränkte sich nur auf das Blut der Arteria femoralis [Kan (1938)]. Tabelle I lässt erkennen, dass sich das Lipoid-P im Vollblut von Vena lienalis und Arteria femoralis dabei vermehrt, und dass Vena lienalis einen höheren Prozentsatz der Vermehrung zeigt als Arteria femoralis.

TABELLE I.

Hund-Nr.	Vor d. Injekt.		5 St. nach d. Injekt.			
	Arteria femoralis mg/dl	Vena lienalis mg/dl	Arteria femoralis mg/dl	Vermehrungs-prozent	Vena lienalis mg/dl	Vermehrungs-prozent
85(♀)	8,09	6,80	9,29	14,6	8,61	21,4
86(♀)	6,21	6,21	6,59	6,1	6,64	8,6
87(♀)	5,99	5,67	6,05	0,6	7,24	34,3

III. Vergleichung des Lipoidphosphors zwischen Vena lienalis und Arteria femoralis bei normalen Hunden.

Um die Differenz der Lipoidphosphormenge zwischen dem Blut von Vena lienalis und dem von Arteria femoralis festzustellen,

habe ich in 7 Fällen die Prüfung vorgenommen. Tabelle II lässt erkennen, dass das Lipoidphosphor im Blut von Arteria femoralis nur von wenig grösserer Menge ist als im Blut von Vena lienalis.

TABELLE II.

Versuche bei 7 Hunden	Arteria femoralis mg/dl	Vena lienalis mg/dl
1	5,21	5,08
2	8,09	6,80
3	8,75	8,64
4	7,64	7,64
5	7,13	7,56
6	6,21	6,21
7	5,99	5,67
Mittel-Wert	7,00	6,80

IV. Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Lipoidphosphor, Lipoid-N und Lipoid-Amino-N im Vollblut bei normalen Hunden.

Die intravenöse Injektion von 5,0 ccm der 3 fach verdünnten Lösung der Blutkörperchen pro kg Körpergewicht bei normalen Hunden ruft eine bedeutende Vermehrung des Lipoid-P hervor. Aber dann entsteht die Frage, welcher Substanz diese Vermehrung entnommen ist. So habe ich in 3 Experimentenfällen ausser Lipoid-P auch noch Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N geprüft. Tabelle III lässt erkennen, das Lipoid-P im Vollblut sich vermehrt nach Injektion des hämolysierten Blutes und der höchste Prozentsatz der Vermehrung beim Hunde Nr. 65 11,2%, beim Hunde Nr. 66 18,3% und beim Hunde Nr. 67 32,8% beträgt, der Mittelwert aus 3 Fällen 20,8%. Diese Vermehrung führt freilich auch die Vermehrung von Lipoid-N herbei, so beträgt der höchste Prozentsatz der Vermehrung von Lipoid-N beim Hunde Nr. 65 34,1%, beim Hunde Nr. 66 54,0% und beim Hunde Nr. 67 18,7%, der Mittelwert aus 3 Fällen nämlich 35,6%. Die Vermehrung von Lipoid-N liefert eine Kurve, die identisch ist der von Lipoid-P. Lipoid-Amino-N

vermehrt sich in 2 Experimentfällen nach Injektion des hämolytierten Blutes, und der höchste Prozentsatz der Vermehrung beträgt beim Hunde Nr. 65 24,6%, beim Hunde Nr. 66 66,3%, durchschnittlich 45,5%. Das Verhältnis von Lipoid-Amino-N zu Lipoid-N steigert sich.

TABELLE III.

Hund. Nr.	Körper- gew. kg	Arten d. Lipoid	Vor. d. Injekt.	Nach d. Injektion					Maximale Vermehrung	
				5 St. mg/dl	7 St. mg/dl	24 St. mg/dl	48 St. mg/dl	72 St. mg/dl	Zeit dabei	Pro- zent
65 (♂)	7,0	Lipoid- P	8,94	7,83	9,94	9,94	9,66		7 St. 24 St.	11,2
		Lipoid- N	16,7	17,1	19,0	22,4	20,3		24 St.	34,1
		Lipoid- NH ₂ -N	1,18	1,47	1,47	1,46	1,46		5 St. 7 St.	24,6
		NH ₂ -N N	$\frac{7,1}{100}$	$\frac{8,6}{100}$	$\frac{7,7}{100}$	$\frac{6,5}{100}$	$\frac{7,2}{100}$			
66 (♂)	5,7	Lipoid- P	5,91	6,30	6,26	6,62	6,70	6,99	72 St.	18,3
		Lipoid- N	12,6	12,3	14,2	15,7	18,2	19,4	72 St.	54,0
		Lipoid- NH ₂ -N	1,75	1,75	2,33	2,04	2,91	2,91	48 St. 72 St.	66,3
		NH ₂ -N N	$\frac{13,9}{100}$	$\frac{14,2}{100}$	$\frac{16,4}{100}$	$\frac{13,0}{100}$	$\frac{16,0}{100}$	$\frac{15,0}{100}$		
67 (♀)	5,4	Lipoid- P	4,75	5,02	5,67	6,31	5,67	5,78	24 St.	32,8
		Lipoid- N	22,5	23,7	26,7	23,1	22,0	24,6	7 St.	18,7

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Ergebnisse sind folgendermassen zusammenzufassen:

1. Dass bei normalen Hunden die Injektion des hämolytierten Blutes in Arteria lienalis 5 Stunden später die Vermehrung von Lipoid-P im Blut der Vena lienalis und Arteria femoralis und eine noch höhere Vermehrung desselben im Blut der Vena lienalis hervorruft.

2. Dass bei normalen Hunden der Lipoid-P im Vollblut der Arteria femoralis nur von wenig grösserer Menge ist als im Blut der Vena lienalis, im Gegensatz zum Resultat bei der Injektion des hämolysierten Blutes in Arteria lienalis.

3. Dass bei normalen Hunden die interavenöse Injektion von 5,0 ccm des hämolysierten Blutes, der 3 fach verdünnten Lösung der Blutkörperchen, die Vermehrung von Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N hervorruft, und dass der höchste Prozentsatz der Vermehrung bei Lipoid-P aus 3 Fällen durchschnittlich 20,8%, bei Lipoid-N aus 3 Fällen durchschnittlich 35,6% und bei Lipoid-NH₂-N aus 2 Fällen durchschnittlich 45,5% beträgt.

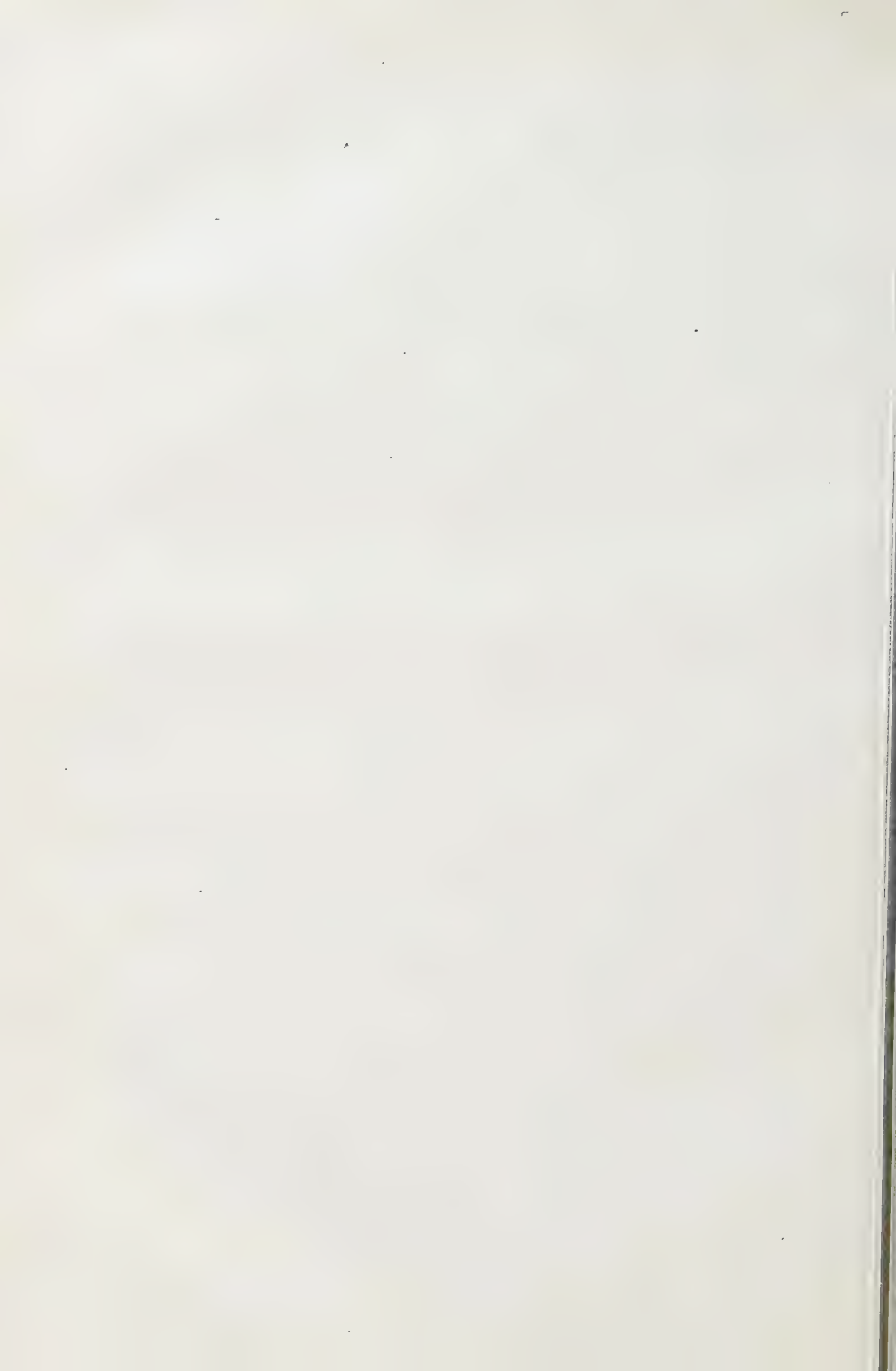
Wie oben kurz erwähnt, habe ich in meinen zwei vorhergehenden Mitteilungen [Kan (1938/1939)] schon folgende Resultate berichtet, dass bei normalen Hunden die intravenöse Injektion von 5,0 ccm der 3 fach verdünnten Lösung der Blutkörperchen pro kg Körpergewicht eine bedeutende Vermehrung des Lipoid-P im Vollblut hervorruft, ein Vorgang, der sich bei normalen Hunden durch Injektion von destilliertem Wasser oder Kollargollösung herbeiführen lässt, dass bei entmilzten Hunden die Injektion des hämolysierten Blutes zwar anfangs eine leichte Vermehrung des Lipoid-P, aber darauf eine Verminderung auf einen niedrigeren Wert als denselben direkt vor der Injektion verursacht, und dass bei Hunden mit dem durch Tuschesuspension oder Thorotrast blockierten reticuloendothelialen System die Injektion des hämolysierten Blutes entweder fast keinen Einfluss auf den Lipoid-P macht, oder eine leichte Vermehrung verursacht, während nach Zerlegung des hämolysierten Blutes in Hämoglobin und Fettstoff die Injektion der Fettstoffemulsion anfangs eine leichte Vermehrung und darauf eine Verminderung des Lipoid-Phosphors hervorruft, im Gegensatz zur Injektion des Hämoglobins, die die Vermehrung des Lipoid-P verursacht, deren Kurve aber eine Identität zeigt mit der bei der Injektion des hämolysierten Blutes selbst, was mich zu dem Schluss geführt hat, dass beim Verfahren des Hämoglobins im reticuloendothelialen System, besonders in der Milz, sich der Lipoid-P vermehrt.

Aus den Ergebnissen des vorliegenden Experimentes ersieht

man, dass die direkte Injektion des hämolysierten Blutes in Arteria lienalis 5 Stunden später eine bedeutende Vermehrung des Lipoid-P im Blut der Vena lienalis hervorruft, dass auch zugleich sich Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N nach der Injektion des hämolysierten Blutes vermehren, was als Beweis dafür dient, dass sich das Kephalin im Blut dabei vermehrt, und dass also ein klares Licht auf den Zusammenhang zwischen Hämoglobinumsatz und Phosphatidumsatz im reticuloendothelialen System, besonders in der Milz, gegeben worden ist.

LITERATUR.

- Kan (1938): Kumamoto Med. J., 1 (Nr. 1), 1.
Kan (1939): „ „ „ 1 (Nr. 3), 123.
Kan (1940): J. Biochem., 31, 55.
Nakashima (1932): J. of Jûzen Med. Soc., 37, 2176.
Takata (1936): J. Biochem., 24, 167.



BEITRAG ZUR KENNTNIS DER SPEICHELAMYLASE.

I. Mitteilung: Über die Globulinnatur der Speichelamylase.

VON

HIDEO NINOMIYA.

(Aus dem Med.-Chem. Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama) und der
III. Med. Klinik (Direktor: Prof. Dr. N. Onodera) der Kaiserl.
Kyūsyū-Universität zu Iukuoka, Japan.)

(Eingegangen am 23. Oktober 1939.)

Über die chemische Natur der Amylasen gehen die Meinungen der verschiedenen Autoren noch auseinander, und zwar liegt die Hauptfrage der Erkenntnis von deren Eiweissnatur darin, wie die Verhältnisse in anderen Fermenten liegen. Wróblewsky erkannte 1898 die Eiweissnatur der Amylasen dadurch, dass die Amylasen durch Pepsin leicht, aber nicht durch Trypsin zerstört wurden. Pozerski (1902), und Terroine und Weil (1912) ermittelten gleichfalls die Eiweissnatur derselben auf der Basis, dass die Amylasen durch Trypsin leicht zerstört worden sind. Pribram (1912) zeigte den hohen Polypeptidgehalt der gereinigten Malzamyase und Sherman (1916) die deutliche Eiweissfällungs- und Eiweissfarbreaktion der gereinigten Takadiastase. Nach Biedermann (1922) sind verschiedene Amylasen, besonders Speichelamylase, komplizierte aus Albumosen und anorganischen Salzen bestehende Verbindungen. Myrbäcks Inaktivierungsversuch (1926) liess die Speichelamylase als Ampholyt erkennen. Caldwell, Bocher und Sherman (1931) gewannen Pankreasamylase als krystallisiertes Eiweiss. Neuerdings beobachteten Tauber und Kleiner (1934) die Verdauung der Speichelamylase durch Trypsin und Papain.

Im Gegensatz dazu erkannten Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse (1924) nicht die Eiweissnatur der gereinigten Pankreasamylase an; auch Fricke und Kaja (1924) lehnten die

Eiweissnatur der Malzamyase ab, weil sie diese Amylase durch Trypsin nicht zerstören und ihr den grössten Teil von Eiweiss durch Reinigung entziehen konnten. Katō (1928) widerlegte die Eiweissnatur der Speichelamyase durch deren Unzerstörbarkeit durch Proteasen. Waldschmidt-Leitz und Reichel (1931) verneinen die Eiweissnatur der Pankreasamyase, und Itoh (1937) ersah, dass die aus *Aspergillus oryzae* hergestellte und gereinigte Amylase nur schwache Eiweissreaktion, aber starke Molischsche Reaktion zeigte; er vermutete daher die Unabhängigkeit der Amylase von Eiweiss, und glaubte, ihr Wesen aller Wahrscheinlichkeit nach im Kohlenhydrat suchen zu dürfen. Akabori und Okahara (1936) lehnen die Eiweissnatur der gereinigten Takadiastase ab. Ich habe also über die Beziehungen zwischen der Aktivität des Ptyalin und den physicochemischen Eigenschaften studiert und komme zu dem Schluss, dass die Speichelamyase eine Globulinnatur besitzt.

I. Untersuchung des dialysierten Speichels.

Wie lange bekannt, treten die Wirkungen der Speichelamyase im salzfreien Zustand nicht auf (z. B. bei Dialyse des Speichels), und durch Zusatz von Salzen, besonders von Chloriden, können dabei die amylytischen Wirkungen wieder vorkommen.

Ich habe die verschiedenen Experimente auf Grund der Tatsachen ausgeführt, dass bei der Dialyse des Speichels die Niederschläge gleichzeitig mit dem Verlust der amylytischen Wirkungen entstehen, und dass ferner bei Zusatz von Salzen, mit dem Verlöschen der Niederschläge, die amylytischen Wirkungen wieder vorkommen.

Als Versuchsmaterial brauchte ich meinen eigenen Speichel, Speichel von Rind, Pferd, Schwein, Schaf, Hund, Ziege u. a., die alle nur wenig oder keine Amylase enthalten. Der entnommene Speichel wurde nach der Filtration zur Untersuchung gestellt. Nachdem der Speichel bei Zusatz von 0.5% Toluol im Paulischen Elektrodialysierapparat mit 15 mA 24 Stunden dialysiert worden war, wurden von diesem Speichel, den abfiltrierten Niederschlägen und auch von den Filtraten die amylytischen Wirkungen nach

der Wohlgemuthschen Methode bestimmt. Als Kontrolle wurde die amylytische Wirkung des nicht dialysierten Speichels bestimmt.

Abweichend von Wohlgemuths Methode wurde bei der Bestimmung jedem Reagenzglas 1 cem *M*/15 Phosphatpuffer von Pn 6,8 und beim Natriumchloridzusatzversuch je 0,05 Mol zugesetzt. Dieser Versuch, mit verschiedenem Speichel 2 mal ausgeführt, ergab die in Tabelle I zusammengestellten Resultate.

TABELLE I.

Untersuchung des dialysierten Speichels.

Versuchs- lösung	Kontrolle + NaCl	Filtrat	Nieder- schlag	Dialy- sierter Speichel	Filtrat + NaCl	Nieder- schlag + NaCl	Dialy- sierter Speichel + NaCl
Amylase D $\frac{40^\circ}{30'}$	250	0	0	0	0	84	84
"	500	0	0	0	7,5	252	260

Wie Tabelle I darstellt, zeigen weder der dialysierte Speichel, noch seine Filtrate oder Niederschläge eine amylytische Wirkung, aber bei Zusatz von Natriumchlorid erscheint diese Wirkung beim dialysierten Speichel und bei den Niederschlägen, indessen bei den Filtraten sehr gering oder gar nicht. Diese geringe Wirkung der Filtrate beruht möglicherweise darauf, dass das Wirksame aus dem Speichel nicht restlos ausscheidet, sondern teilweise in den Filtraten zurückbleibt.

Unter diesem Gesichtspunkte betrachtet, liegt es also nahe anzunehmen, dass das Wirksame der Speichelamylase in den Niederschlägen des dialysierten Speichels liegt. Wie in der Einleitung dieses Kapitels erwähnt, verlöschen die Niederschläge des dialysierten Speichels bei Zusatz von Salzen. Da als wasserunlösliche und in verdünnter Salzlösung lösliche Substanz in erster Linie Globulin in Betracht kommt, habe ich bei den weiteren Untersuchungen unter der Vermutung gearbeitet, dass die Speichel-

amylase eine globulinartige Substanz sein könnte.

II. Fraktionierung von Speichelprotein.

Aus dem Speichel wurde die Globulin- und die Albuminfraktion mit Halbsättigung mit gesättigtem Ammoniumsulfat fraktioniert. Nach der Filtration wurden die Niederschläge, d. h. die Globulinfraktion, mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung genügend gespült. Dann wurden die beiden Fraktionen in Kollodiumbeuteln unter fließendem Wasser 2 Tage dialysiert und mit Wasser zu gleichen Teilen gebracht.

Die amylolytische Wirkung der Globulin- und der Albuminfraktion und des Gemisches von beiden Fraktionen zu gleichen Teilen sowie des nicht fraktionierten Speichels als Kontrolle wurde bei Zusatz von je 0.05 Mol Natriumchlorid nach Wohlgemuths Methode bestimmt. Dabei wurde jedem Reagenzglas 1 ccm *M*/15 Phosphatpuffer von *pH* 6,8 zugesetzt. Diese Untersuchung wurde mit verschiedenem Speichel 2 mal wiederholt; die Resultate finden sich in Tabelle II.

TABELLE II.

Amylase-Wert ($D_{30}^{40^\circ}$) des dialysierten Speichels nach dem Fraktionieren.

Versuchs- lösung	Kontrolle + NaCl	Globulin- fraktion	Albumin- fraktion	Globulin- fraktion + NaCl	Albumin- fraktion + NaCl	Globulin- frak. + Al- buminfrak. + NaCl
1	500	0	0	340	1	360
2	500	0	0	362	0	362

Die Globulinfraktion zeigt deutliche amylolytische Wirkung, aber die Albuminfraktion sehr geringe. Das leichte Zurückstehen der amylolytischen Wirkung von Globulinfraktion und Gemisch von beiden Fraktionen hinter der Kontrolle muss auf dem Verlust der wirksamen Substanz beim Fraktionieren beruhen.

III. Bedeutung der Salze als Aktivator der Speichelamylase.

Wie schon allgemein anerkannt, tritt die Wirkung der Speichelamylase im salzfreien Zustand nicht auf, aber bei Zusatz von Salzen kommt ihre Wirkung wieder hervor. Die Reihenfolge der Aktivierungskraft der Salze ist Chlorid > Bromid > Nitrat > Sulfat > Acetat > Phosphat, wobei die des Chlorids auffallend stark ist. Dabei fragt es sich, ob die Salze sich an ein Ferment binden oder nur katalytisch wirken; in der Gegenwart ist man der Auffassung, dass ein Anion, z. B. Cl^- , unter Verbindung mit einem Ferment, beispielsweise unter Bildung der Chloramylase, wirkt.

Nach meiner Beobachtung ist die Speichelamylase ein Globulin oder eine globulinartige Substanz. Daher ist die Annahme sehr wahrscheinlich, dass die aktivierende Wirkung der Salze einfach der Fähigkeit zugeschrieben werden kann, Globulin zu lösen. Um einen Beweis dafür zu erbringen, habe ich ein Experiment durchgeführt, das erkennen lässt, wie die Konzentration der Salze die Löslichkeit des Globulins und gleichfalls die Aktivität der Amylase beeinflusst.

Das gereinigte Globulin aus Speichel wurde mit $M/15$ Phosphatpuffer von $\text{pH } 6,8$ auf die ursprüngliche Menge des Speichels verdünnt, und bei Zusatz von verschiedenen Mengen von Koehsalz wurde die Trübung und die Aktivität der Amylase gemessen.

Die Resultate finden sich in Tabelle III und Figur 1. Die Aktivität der Speichelamylase ist umgekehrt proportional zur Turbidität, mit anderen Worten, die Aktivität ist proportional der

TABELLE III.

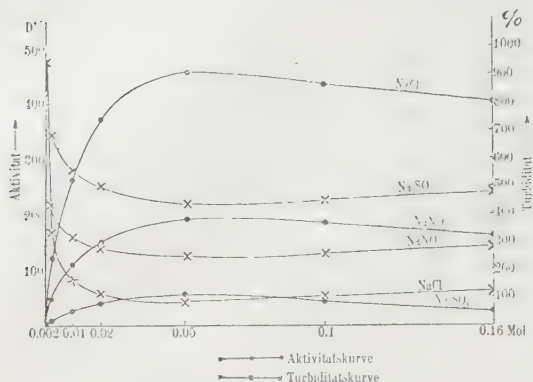
Einfluss von Chlorid auf dialysierten Speichel.

NaCl (Mol)	0	0,002	0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	1,0
Turbidität (%)	950	330	150	104	95	97	104	104,5	110
Aktivität (D_{30}^{40})	0	122	260	370	454	431	399	360	280

Löslichkeit der Speichelamylase. Der Punkt, bei welchem die Löslichkeit und Aktivität am grössten sind, ist bei Zusatz von 0,05 Mol Natriumchlorid.

Fig. 1.

Einfluss von Salzen auf dialysierten Speichel.



Dann wurde dasselbe Experiment mit Nitrat bzw. Sulfat ausgeführt, um zu erfahren, ob die schwächere Wirkung des Nitrates bzw. des Sulfates auf der schwächeren Lösungsfähigkeit von Globulin beruht. Die Resultate finden sich in Tabelle IV, V und Figur 1.

Das Vermögen des Nitrates bzw. des Sulfates Amylase zu lösen steht dem des Chlorides weit nach.

TABELLE IV.

Einfluss von Nitrat auf dialysierten Speichel.

NaNO_3 (Mol)	0	0,002	0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	1,0
Turbidität (%)	950	424	345	302	263	268	280	301	353
Aktivität ($D_{40}^{30'}$)	0	48	104	145	181	170	158	144	90

IV. Die Unterschiede von Speichelamylase und Takadiastase bei Dialyse.

Es hat sich herausgestellt, dass die Speichelamylase eine Globulinnatur besitzt, und dass die Bedeutung der Salze als Aktivator der Speichelamylase in solchem Verhältnis besteht, wie

TABELLE V.
Einfluss von Sulfat auf dialysierten Speichel.

Na_2SO_4 (Mol)	0	0,002	0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	1,0
Turbidität (%)	950	668	530	495	420	447	489	496	552
Aktivität (D_{40° D_{30°)	0	12	28	35	46	42	38	35	22

die Salze der Amylase Löslichkeit geben. Um zu erkennen, welchen Anteil die Salze an der aus *Aspergillus oryzae* hergestellten und durch Salze nicht aktivierten pflanzlichen Takadiastase besitzen, wurde folgender Versuch angestellt.

1 g/dl gereinigte Takadiastaselösung (Sankyō) wurde bereitet und in Paulis elektrischem Dialysierapparat bei 15 mA dialysiert, und die Turbidität wurde in bestimmten Zeitabschnitten nephelometrisch bestimmt. Auch mit frischem Speichel wurde dasselbe Dialysierverfahren wiederholt, und der Zuwachs an Turbidität wurde beobachtet. Die Resultate finden sich in Tabelle VI und VII. Die Turbidität der Speichelamylase nimmt mit der Zeit zu, aber die der Takadiastase nicht.

Die oben erwähnte Tatsache, dass die Turbidität bei der Speichelamylase mit der Zeit zunimmt, aber bei der Takadiastase nicht, bedeutet, dass bei der Speichelamylase die Globulinaus-

TABELLE VI.
Zusammenhang zwischen Dialyse und Turbidität der Speichelamylase.

Verlauf (Stdh.)	0	1	3	5	10	24
Turbidität (%)	80	97	120	160	270	950

scheidung mit der Verminderung der Salze Hand in Hand geht, aber bei Takadiastase solche Erscheinung nicht auftritt. Und zwar bedeutet die nicht aktivierende Wirkung der Salze auf Takadiastase die Nutzlosigkeit der Salze für die Löslichkeit dieses Fermentes.

TABELLE VII.

Zusammenhang zwischen Dialyse und Turbidität der Takadiastase.

Verlauf (Std.n.)	0	1	3	5	10	24
Turbidität (%)	190	190	190	190	198	198

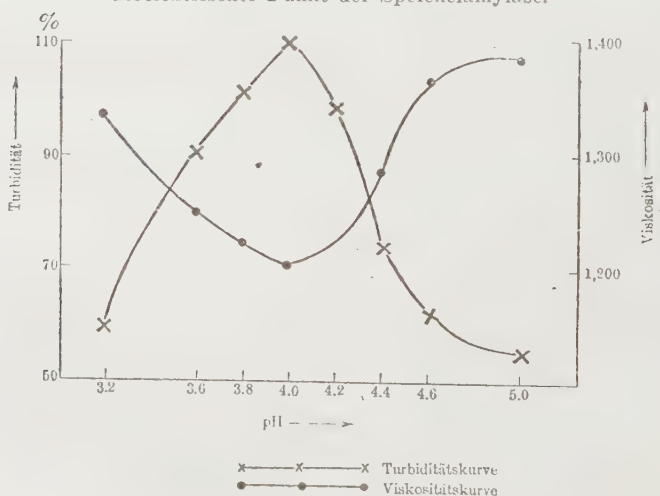
V. *Der isoelektrische Punkt der Speichelamylase und die Ph-Abhängigkeit von deren Wirkungen.*

Wenn die Speichelamylase wirklich ein Globulin ist, so muss sie den isoelektrischen Punkt dort haben, wo die Löslichkeit des Globulins und auch die Viskosität von deren Lösungen ein Minimum zeigt. Von gereinigter Speichelamylaselösung, dargestellt wie oben erwähnt, habe ich versucht, solchen Punkt zu finden.

10 ccm der AmylaseLösung wurde bei Zusatz von 5 ccm $M/5$ Acetatpuffer von verschiedenen PH genügend gerührt, und nach 3 Minuten wurde die Trübung mit dem Pellinschen Nephelometer und die Viskosität mit dem Ostwaldschen Viskosimeter gemessen. Die Resultate finden sich in Figur 2. Die Viskosität ist bei PH 4,0

Fig. 2.

Isoelektrischer Punkt der Speichelamylase.

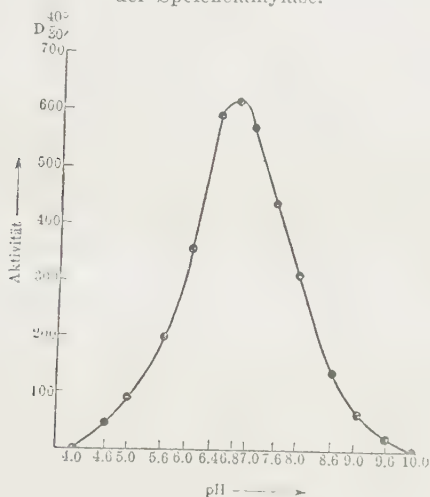


am kleinsten und die Turbidität am grössten.

Gemäss der Turbiditäts- und Viskositätsbestimmung lag der isoelektrische Punkt der Speichelamylase an pH 4,0. Es ist auch interessant, dass, wie in Figur 3 dargestellt, die Speichelamylase bei pH 4,0 ihre Wirkung ganz verliert. Hier wurde für die pH 3,8–5,0 $M/5$ Acetatgemisch, für pH 5,6–8,0 $M/15$ Phosphatgemisch, und für 8,6–10,0 Boratgemisch gebraucht.

Fig. 3.

Verhältnis der Wasserstoffionenkonzentration zur Aktivität der Speichelamylase.



ZUSAMMENFASSUNG.

Ich habe verschiedene Experimente über das chemische Wesen der Speichelamylase ausgeführt, auf Grund der Tatsache, dass die Wirkungen der Speichelamylase im salzfreien Zustand nicht auftreten, dass bei der Dialyse des Speichels die Niederschläge gleichzeitig mit dem Verlust der amylytischen Wirkungen entstehen, und dass ferner bei Zusatz von Salzen, mit dem Verlöschen der Niederschläge, die amylytischen Wirkungen wieder vorkommen.

Die Versuchsergebnisse sind folgende:

1. Beim dialysierten Speichel zeigen die Niederschläge die amylytischen Wirkungen, aber die Filtrate nicht.

2. Beim Fraktionieren des Speichels mit gesättigtem Ammoniumsulfat zeigen die Globulinfractionen deutliche amylytische Wirkungen, aber die Albuminfractionen gar nicht.

3. Die Speichelamylase wird bei Zusatz von 0,05 Mol Natriumchlorid am besten aktiviert, und die Löslichkeit der Speichelamylase ist dabei am grössten. Daraus geht hervor, dass die Bedeutung der Salze als Aktivator der Speichelamylase in solchem Verhältnis besteht, wie die Salze der Speichelamylase die Löslichkeit geben.

4. Das optimale PH der gereinigten Speichelamylase ist 6,8, ihr Wirkungskreis liegt zwischen PH 4,0–10,0.

5. Bei Dialyse der gereinigten Takadiastase, welche durch Chlorid nicht aktiviert wird, entstehen keine Niederschläge.

6. Der isoelektrische Punkt der Speichelamylase liegt an PH 4,0.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Kodama und Herrn Prof. Dr. N. Onodera von der Kaiserlichen Universität zu Hukuoka für die Anregung und die Leitung dieser Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. A. Ueta von der Med. Fachschule zu Kurume für die lebenswürdige Unterstützung meinen besten Dank sagen.

LITERATUR.

- Akabori u. Okahara (1936): Nippon Kagaku Kaisi, 5, 57.
 Biedermann (1922): Biochem. Zeitschr., 127, 38.
 Caldwell, Bocher & Sherman (1931): Science, 74.
 " " " (1932): Chem. Ztrblt.
 Fricke u. Kaja (1924): Ber. Deut. Chem. Gesell., 57, 310, 313.
 Itoh, R. (1936): Journ. of Biochem., 23, 1.
 Katō, M. (1928): Eiyōkenkyūsyō Hōkoku, Vol. 2.
 Myrbäck (1926): Zeitschr. Physiol. Chem., 159, 6.
 Pozerski: zitiert nach Oppenheimer „Die Fermente und ihre Wirkungen“.
 Pribram (1912): Biochem. Zeitschr., 44, 293.
 Tauber u. Kleiner (1934): Journ. Biol. Chem., 105, 411.
 Terroine u. Weil: zitiert nach Biedermann.
 Waldschmidt-Leitz u. Reichel (1932): Zeitschr. Physiol. Chem., 204, 197.
 Willstätter, Waldschmidt-Leitz u. Hesse (1923): Zeitschr. Physiol. Chem., 126, 143.
 Wroblewsky (1898): Zeitschr. Physiol. Chem., 24, 173.

UNTERSUCHUNG ÜBER DEN PHOSPHATIDUMSATZ.

Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf den
Lipoidphosphor im Blutplasma und in den
geformten Blutbestandteilen.

VON

SEKISEN KAN.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 4. November 1939.)

Nach den vorhergehenden Mitteilungen (Kan, 1938, 1939, 1940), "Über den Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf das Phosphatid im Blut," dann über "Einflüsse der Injektion verschiedener Bestandteile des hämolysierten Blutes auf das Blutphosphatid" und ferner über "Einflüsse der Injektion des hämolysierten Blutes auf Phosphatide im Blut der Vena lienalis und der peripheren Blutgefäße," kann bei normalen Hunden die intravenöse Injektion des hämolysierten Blutes die Menge von Lipoid P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N im Vollblut bedeutend vermehren, was auf die Wirkung des injizierten Hämoglobins zurückzuführen ist. Im vorliegenden Aufsatz möchte ich die Ergebnisse des Experimentes mitteilen, das der Aufklärung der Frage gewidmet ist, auf welches von Blutplasma und geformten Blutbestandteilen denn die Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Vollblut zurückzuführen ist, ob zwischen der Vermehrung des Lipoid-Phosphors und der Zahlenschwankung der geformten Blutbestandteile ein bestimmter Zusammenhang besteht.

EXPERIMENT.

I. Versuchsmethode.

Wegen der Bestimmung von Lipoid-Phosphor, Lipoid-N und Lipoid-Amino-N, der Blutentnahme, des Versuchstiers usw. ver-

weise ich auf die vorhergehende Mitteilung. Die Volummetrie der geformten Blutbestandteile steht schon in meiner Mitteilung [Kan (1937) "Über die gegenseitige Beziehung zwischen dem Phosphatid in Blut und Galle"].

II. Einfluss der Blutentnahme auf die Lipoid-Phosphormenge im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen des normalen Hundes.

Im 1. Fall (beim Hunde Nr. 35) beträgt die Menge des Lipoid-Phosphors im Blutplasma direkt vor dem Eintritt des Experimentes 6,78 mg/dl, in der 7. Stunde 5,91 mg/dl, in der 24. Stunde 6,56 mg/dl, und in der 48. Stunde fast des Gleiche wie in der 7. Stunde. Die Menge des Lipoid-Phosphors in geformten Blutbestandteilen beträgt direkt vor dem Eintritt des Experimentes 12,55 mg/dl, in der 24. Stunde fast das Gleiche wie vor dem Versuch, aber in der 5., 7., 48. Stunde vermindert sich der Wert, der besonders in der 7. Stunde 10,52 mg/dl und am niedrigsten ist. Die Menge des Lipoid-Phosphors im Vollblut (Die Totalsumme des Lipoid-Phosphors in Plasma und Zellen) ist in der 5., 7., 24., 48. Stunde niedriger als vor dem Eintritt des Experimentes und in der 7. Stunde am niedrigsten.

Im 2. Fall (beim Hunde Nr. 38) beträgt die Menge des Lipoid-Phosphors im Blutplasma direkt vor dem Eintritt des Experimentes 3,28 mg/dl, ist aber in der 5., 7., 24. Stunde niedriger, wenn sie

TABELLE I. (Hund Nr. 35 ♂ 10 kg).

Zeit d. Blutent- nahme	Lipoid-P					Volum d. geform. Bestand.
	Blut 1,0 cem			Blut- plasma (mg/dl)	Geform. Bestand. (mg/dl)	
	Blut- plasma mg	Geform. Bestand. mg	Voll- Blut mg			
zuerst	0,0485	0,0356	0,0841	6,78	12,55	28,4
5. St.	0,0479	0,0336	0,0815	6,80	11,39	29,5
7. St.	0,0398	0,0343	0,0741	5,91	10,52	32,6
24. St.	0,0456	0,0383	0,0839	6,56	12,56	30,5
48. St.	0,0409	0,0397	0,0806	6,07	12,18	32,6

TABELLE II. (Hund Nr. 38 ♀ 5,3 kg).

Zeit d. Blutent- nahme	Lipoid-P					Volum d. geform. Bestand.
	Blut 1,0 cem			Blut- plasma (mg/dl)	Geform. Bestand. (mg/dl)	
	Blut- plasma mg	Geform. Bestand. mg	Voll- Blut mg			
zuerst	0,0214	0,0432	0,0646	3,28	12,45	34,7
5. St.	0,0206	0,0429	0,0635	3,16	12,36	34,7
7. St.	0,0207	0,0356	0,0563	3,07	10,92	32,6
24. St.	0,0193	0,0369	0,0562	2,78	12,10	30,5
48. St.	0,0240	0,0370	0,0610	3,56	11,35	32,6

auch in der 48. Stunde etwas höher ist. Die Menge des Lipoid-Phosphors in den geformten Blutbestandteilen beträgt direkt vor dem Eintritt des Experimentes 12,45 mg/dl, ist in der 5., 7., 24., 48. Stunde niedriger und besonders in der 7. Stunde (10,9 mg/dl) am niedrigsten. Die Menge im Vollblut beträgt in der 48. Stunde fast das Gleiche wie vor dem Eintritt des Experimentes und ist in der 5., 7., 24. Stunde niedriger, besonders in der letztgenannten.

Fig. 1 A.

Blutplasma

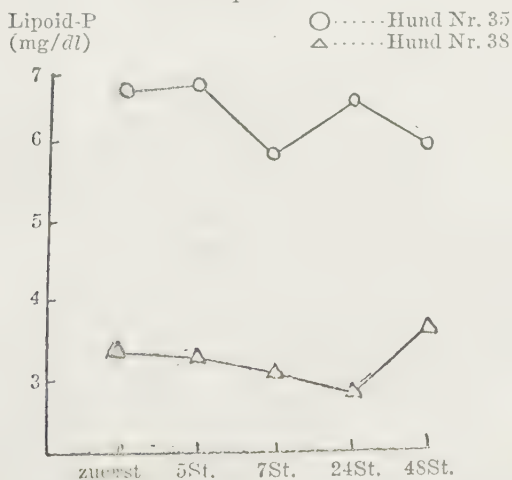


Fig. 1 B.

geform. Bestandteile

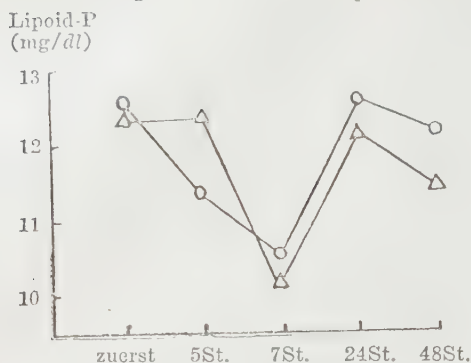
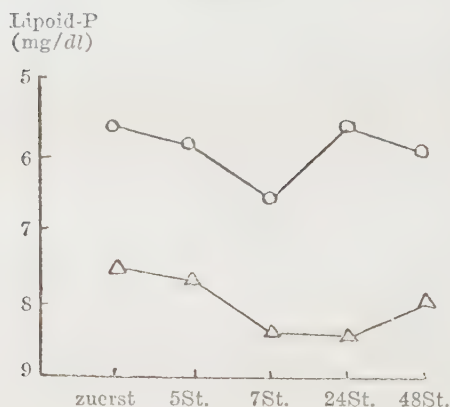


Fig. 1 C.

Vollblut



Wie oben erwähnt, betrug die Blutentnahme, jedesmal 6,0 ccm, im ganzen 30,0 ccm [direkt vor dem Experiment, in 5., 7., 24., 48. Stunde darauf, also 5 malige Blutentnahme]. Darm führte ich die Bestimmung durch, um über den Einfluss der Blutentnahme auf die Menge des Lipoid-Phosphors im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen genaue Kenntnis zu bekommen. Der Wert in der 5., 7., 24., 48. Stunde ist sowohl im Blutplasma als auch in den geformten Blutbestandteilen niedriger als vor dem

Eintritt des Experimentes, besonders in der 7. und 24. Stunde viel niedriger und in der 7. Stunde am niedrigsten, was mit den experimentellen Ergebnissen in meiner vorigen Mitteilung "Über den Einfluss der Blutentnahme auf die Lipoid-Phosphormenge im Vollblut des normalen Hundes" gänzlich übereinstimmt.

III. Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf die Lipoid-Phosphormenge im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen des normalen Hundes.

Im 1. Fall (beim Hunde Nr. 36) beträgt die Menge des Lipoid-Phosphors im Blutplasma direkt vor der Injektion des hämolysierten Blutes 5,71 mg/dl, aber in der 5., 7., 24., 48. Stunde nach der Injektion fast das Gleiche wie beim Kontrolltier. Der Wert des Lipoid-Phosphors in den geformten Blutbestandteilen beträgt direkt vor der Injektion 9,02 mg/dl, in der 7. Stunde nach der Injektion 10,41 mg/dl und ist in der 24. Stunde ebenso hoch. Der Wert im Vollblut ist in der 5. und 7. Stunde etwas höher als bei den Kontrolltieren.

Im 2. Fall (beim Hunde Nr. 37) beträgt der Wert des Lipoid-Phosphors im Blutplasma direkt vor der Injektion des hämolysierten Blutes 5,83 mg/dl, steigert sich in der 5., 7., 24., 48. Stunde nach der Injektion, und erreicht besonders in der 48. Stunde den höchsten Wert (7,43 mg/dl). Der Wert des Lipoid-Phosphors in geformten Blutbestandteilen beträgt direkt vor der Injektion 12,58 mg/dl, bleibt in der 5. Stunde ganz gleich und vermindert sich von der 7. Stunde ab. Der Wert im Vollblut ist nach der Injektion höher als direkt vor der Injektion und in der 5. Stunde besonders hoch.

Im 3. Fall (beim Hunde Nr. 39) beträgt der Wert des Lipoid-Phosphors im Blutplasma direkt vor der Injektion des hämolysierten Blutes 5,72 mg/dl, ist in der 5. und 48. Stunde ganz gleich wie vor der Injektion und in der 7. und 24. Stunde etwas höher. Der Wert des Lipoid-Phosphors in den geformten Blutbestandteilen beträgt vor der Injektion 12,53 mg/dl, steigert sich in der 5., 7., 24., 48. Stunde und ist in der 24. Stunde am höchsten und beträgt

15,63 mg/dl. Der Wert des Lipoid-Phosphors im Vollblut steigert sich nach der Injektion und ist in der 5., 7., 24., 48. Stunde höher als direkt vor der Injektion und in der 24. Stunde besonders hoch.

Wie schon erwähnt, wurden in 3 Experimentsfällen die folgenden Tatsachen festgestellt. Im ersten Fall (beim Hunde Nr. 36) ist der Wert des Lipoid-Phosphors im Blutplasma in der 5. Stunde nach der Injektion etwas höher und darauf etwas niedriger als vor der Injektion, während der Wert des Lipoid-Phosphors in den geformten Blutbestandteilen in der 7. und 24.

TABELLE III. (Hund Nr. 36 ♀ 16,2 kg).

Zeit d. Blutent- nahme		Lipoid-P				Volum d. geform. Bestand.	
		Blut 1,0 ccm			Blut- plasma (mg/dl)		Geform. Bestand. (mg/dl)
		Blut- plasma mg	Geform. Bestand. mg	Voll- Blut mg			
Vor d. Injekt.		0,0335	0,0370	0,0705	5,72	9,02	41,0
Nach d. Injektion.	5. St.	0,0342	0,0374	0,0716	5,86	9,00	41,6
	7. St.	0,0346	0,0405	0,0751	5,67	10,41	38,9
	24. St.	0,0325	0,0382	0,0707	5,32	9,82	38,9
	48. St.	0,0300	0,0367	0,0667	4,87	10,11	36,3

TABELLE IV. (Hund Nr. 37 ♂ 11,3 kg).

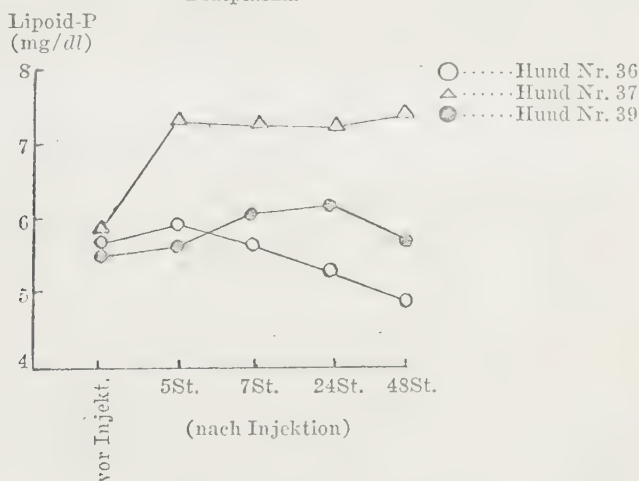
Zeit d. Blutent- nahme		Lipoid-P				Volum d. geform. Bestand.	
		Blut 1,0 ccm			Blut- plasma (mg/dl)		Geform. Bestand. (mg/dl)
		Blut- plasma mg	Geform. Bestand. mg	Voll- Blut mg			
Vor d. Injekt.		0,0368	0,0463	0,0831	5,83	12,58	36,8
Nach d. Injektion.	5. St.	0,0452	0,0491	0,0943	7,39	12,62	38,9
	7. St.	0,0435	0,0432	0,0867	7,25	10,80	40,0
	24. St.	0,0468	0,0404	0,0872	7,29	11,28	35,8
	48. St.	0,0465	0,0370	0,0835	7,43	9,89	37,4

TABELLE V. (Hund Nr. 39 ♂ 7,4 kg).

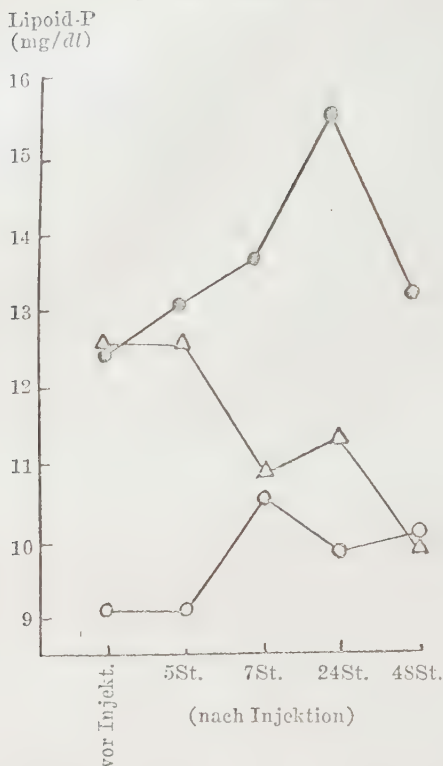
Zeit d. Blutent- nahme		Lipoid-P				Volum d. geform. Bestand.	
		Blut 1,0 cem			Blut- plasma (mg/dl)		Geform. Bestand. (mg/dl)
		Blut- plasma mg	Geform. Bestand. mg	Voll- Blut mg			
Vor d. Injekt.		0,0355	0,0475	0,0830	5,72	12,53	37,9
Nach d. Injektion.	5. St.	0,0367	0,0470	0,0837	5,71	13,13	35,8
	7. St.	0,0404	0,0460	0,0864	6,10	13,65	33,7
	24. St.	0,0422	0,0494	0,0916	6,17	15,63	31,6
	48. St.	0,0391	0,0460	0,0851	5,72	13,20	31,6

Fig. 2 A.

Blutplasma



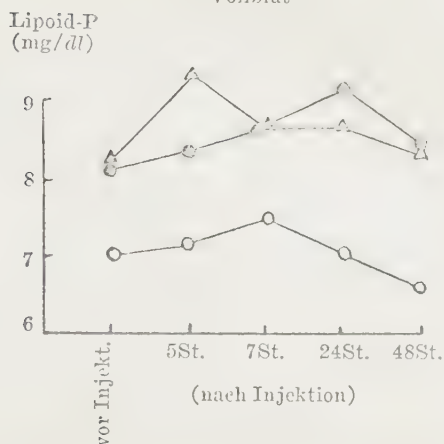
Stunde nach der Injektion höher ist. Im 2. Fall (beim Hunde Nr. 37) ist der Wert des Lipoid-Phosphors im Blutplasma in der 5., 7., 24., 48. Stunde nach der Injektion höher als vor der Injektion, während der Wert des Lipoid-Phosphors in den geformten Blutbestandteilen in der 5. Stunde nach der Injektion ganz gleich ist wie vor der Injektion, sich darauf aber vermindert. Im 3. Fall

Fig. 2 B.
geform. Bestandteile

(beim Hunde Nr. 39) ist der Wert des Lipoid-Phosphors im Blutplasma in der 7. und 24. Stunde höher, während der Wert des Lipoid Phosphors in den geformten Blutbestandteilen in der 5., 7., 24., 48. Stunde nach der Injektion höher ist als vor der Injektion. Der Wert des Lipoid-Phosphors im Vollblut, die Totalsumme des Lipoid-Phosphors im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen, steigert sich im 1. Fall in der 5. und 7. Stunde nach der Injektion, im 2. Fall in der 5., 7., 24., 48. Stunde und im 3. Fall in der 5., 7., 24. Stunde, was mit den experimentellen Ergebnissen in meiner vorigen Mitteilung [Kan (1938), "Über den Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf den Lipoid-

Fig. 2 C.

Vollblut



Phosphor im Vollblut des normalen Hundes"] übereinstimmt. Im grossen und ganzen vermehrt sich der Lipoid-Phosphor nach der Injektion des hämolysierten Blutes beim Hunde Nr. 36 in den geformten Blutbestandteilen, beim Hunde Nr. 37 im Blutplasma und beim Hunde Nr. 39 sowohl im Blutplasma als auch in den geformten Blutbestandteilen.

IV. Die Menge von Lipoid-N und Lipoid-Amino-N in dem Falle des Zusatzes an Kephalin zu den geformten Blutbestandteilen in vitro.

Die Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Blut wird, wie schon erwähnt, durch die Injektion des hämolysierten Blutes sowohl im Blutplasma als auch in den geformten Blutbestandteilen herbeigeführt, wenn sie auch nicht parallel vonstatten geht. Nämlich die Vermehrung tritt manchmal im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen zugleich in Erscheinung, manchmal aber vermehrt sich der Lipoid-Phosphor in dem ersteren und vermindert sich in der letzteren und umgekehrt; was mich zum folgenden Experiment veranlasste.

Das Experiment wurde am Blut des normalen Hundes und am Blut des mit hämolysiertem Blut injizierten Hundes (6 Stunden

nach der Injektion) unter ein und derselben Bedingung gestellt. Das zu benutzende Blut wurde aus der Arteria femoralis entnommen und durch Zusatz von Natriumzitrat vor Gerinnung geschützt.

(1. *Reagenzglas*) enthält geformte Blutbestandteile (man zentrifugiert 10,0 ccm Blut, läßt niederschlagen, isoliert vom Blutplasma und wäscht 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung) und 2,0 ccm Emulsion des 0,1% Kephals in physiologischer Kochsalzlösung.

(2. *Reagenzglas*) enthält 10,0 ccm Blut und 2,0 ccm Emulsion des 0,1% Kephals in physiologischer Kochsalzlösung.

(3. *Reagenzglas*) enthält nur 10,0 ccm Blut.

Diese alle drei werden mit dem Blut des normalen Hundes und dem Blut des mit hämolysierten Blut injizierten Hundes bereitet und im Brutschrank bei 37° 5 Stunden lang aufbewahrt, man schüttelt oft, um eine vollständige Mischung zu erzielen. Man nimmt das Reagenzglas aus dem Schrank, isoliert die geformten Blutbestandteile, wäscht sie 5 mal mit physiologischen Kochsalzlösung, setzt Alkohol und Äther zu gleichen Teilen zu, extrahiert sie 24 Stunden lang, filtriert sie dann in einen 50,0 ccm Messkolben, setzt dem Rückstand wieder Alkohol-Äther zu, kocht ihn auf dem

TABELLE VI.

		Geform. Bestand. + Kephalin (mg/dl)	Geform. Bestand. + Blutplasma + Kephalin (mg/dl)	Geform. Bestand. + Blutplasma (mg/dl)	Volum. d. geform. Bestand. %
Injiz. Hund	Normal Hund 1	Lipoid-N	24,77	24,17	25,24
		Lipoid-NH ₂ N	10,85	10,34	11,06
	Normal Hund 2	Lipoid-N	33,13	28,77	35,00
		Lipoid-NH ₂ N	6,78	5,85	7,71
Injiz. Hund	Hund 1	Lipoid-N	40,57	38,24	42,12
		Lipoid-NH ₂ N	13,99	25,18	25,18
	Hund 2	Lipoid-N	30,18	27,69	33,73
		Lipoid-NH ₂ N	5,92	9,04	8,42

Wasserbad 30 Sekunden lang und filtriert. Dann wäscht man das Reagenzglas 3 mal mit Alkohol-Äther, sammelt den ganzen Extrakt in den Messkolben und füllt bis 50,0 ccm auf. Man bestimmt mit 15,0 ccm davon Lipoid-N und mit 30,0 ccm Lipoid-NH₂-N. Das Ergebnis ist aus Tabelle VI ersichtlich.

Aus Tabelle VI ergibt sich, dass die Menge von Lipoid-N und Lipoid-Amino-N in den geformten Blutbestandteilen, die man nach Zusatz der Kephalin-Emulsion bei 37° 5 Stunden lang erwärmt, keine bedeutende Schwankung gegen die Kontrolle zeigt.

ZUSAMMENFASSUNG.

Obige Ergebnisse werden folgenderweise zusammengefasst.

1. Die intravenöse Injektion der 3 fachen Verdünnung des hämolysierten Blutes 5,0 ccm per 1 kg Körpergewicht führt zur Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen. Diese Vermehrung aber geht nicht immer parallel vonstatten; bald stimmen beide miteinander überein, bald kommt die Vermehrung nur auf der einen Seite vor, während sogar auf der andern eine Verminderung vorkommt.

2. In der vorhegehenden Mitteilung (Kan, 1940) habe ich berichtet, dass durch die Injektion des hämolysierten Blutes nicht nur der Lipoid-Phosphor, sondern auch Lipoid-N und Lipoid-Amino-N vermehrt werden.

3. Die Menge von Lipoid-N und Lipoid-Amino-N in geformten Blutbestandteilen, die nach Zusatz der Kephalin-Emulsion bei 37° 5 Stunden lang erwärmt waren, zeigt im Vergleich mit der Kontrolle, keine bedeutende Veränderung.

Nämlich das Experiment *in vitro* stimmt mit dem *in vivo* darin überein, dass die Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Blutplasma keinen Einfluss auf die geformten Blutbestandteile ausübt.

Die Schwankung des Lipoid-Phosphors im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen, die in diesem Experiment bestätigt wurde, (vgl. 1 und 2), ist auf die dem Lebewesen eigentümliche Reaktion zurückzuführen, die bei der Behandlung des Hämoglobins in den Bestandteilen des hämolysierten Blutes durch die Verwandlung des reticuloendothelialen Systems, be-

sonders der Milzfunktion, hervorgerufen wurde.

Ich habe zugleich auch das Blutbild geprüft, worüber ich die Resultate schon in meiner Mitteilung [Kan (1938) "Einflüsse der Injektion des hämolysierten Blutes auf das Blutbild des Hundes"] niedergelegt habe, nämlich dass die intravenöse Injektion des hämolysierten Blutes die Vermehrung der Erythrocyten, Leucocyten und Thromboeyten in peripheren Venen (Vena auricularis) hervorruft, eine Vermehrung, die mit der Vermehrung des Lipoid-Phosphors in den geformten Blutbestandteilen gar nicht übereinstimmt. Andererseits aber vermehrt sich durch diese Injektion der Lipoid-Phosphor im Blutplasma, woraus sich ergibt, dass kein bestimmter Zusammenhang zwischen der durch die intravenöse Injektion des hämolysierten Blutes herbeigeführten Vermehrung des Lipoid-Phosphors im Blut des milzhaltigen normalen Hundes und der Zahlenschwankung der geformten Blutbestandteile besteht.

Im grossen und ganzen ruft die Injektion des hämolysierten Blutes bei normalen Hunden die Vermehrung des Phosphatides im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen hervor; eine Vermehrung, die auf beiden Seiten nicht immer parallel vorstatten geht, bald stimmen beide Vermehrungen miteinander überein, bald vermehrt sich das Phosphatid auf der einen Seite, während es auf der anderen Seite sich vermindert. Kein bestimmter Zusammenhang besteht zwischen der Vermehrung des Phosphatides und der Zahlenschwankung der geformten Blutbestandteile, die durch die Injektion des hämolysierten Blutes verursacht wurden; mit anderen Worten, beruht die Vermehrung des Phosphatides im Blut gar nicht auf der Vermehrung der Zahlen der geformten Blutbestandteile.

LITERATUR.

- Kan (1937): Kumamoto Igakukai Zasshi, 13 (Nr. 5), 829.
Kan (1938): Kumamoto Igakukai Zasshi, 14 (Nr. 10), 1857
Kan (1938): Kumamoto Med. J., 1 (Nr. 1), 1.
Kan (1939): Kumamoto Med. J., 1 (Nr. 3), 123.
Kan (1940): J. of Biochem., 31, 61.

UNTERSUCHUNG ÜBER DEN PHOSPHATIDUMSATZ.

Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂N in Milz und Leber.

Von

SEKISEN KAN.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät,
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 9. November 1939)

Injiziert man dem normalen Hunde hämolysiertes Blut in die Arteria lienalis, so vermehrt sich wesentlich das Lipoid-P im Vollblut der Vena lienalis 5 Stunden nach der Injektion; injiziert man es ihm in die Ohrvene, so vermehren sich beträchtlich 5–7 Stunden nach der Injektion Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂N im Blut der Arteria femoralis [Kan (1939)]. Um den Zustand von Milz und Leber während des Vermehrungsstadiums dieser Substanzen im Blut zu beobachten, habe ich nun dem normalen Hunde 5,0 ccm hämolysiertes Blutes pro kg Körpergewicht in die Ohrvene injiziert, 6 Stunden darauf durch Blutentziehung den Tod herbeigeführt und dann die Milz und die Leber exstirpiert, um sie zur Untersuchung heranzuziehen. Einen Teil des Organs verreise ich mit Schmirgel, extrahiere ihn warm mit einer Mischung von Alkohol und Äther zu gleichen Teilen, gebe die Extraktion in den Messkolben von 100,0 ccm hinein und benutze je 10,0 ccm davon zur Prüfung von Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂N. Wegen der Untersuchungsmethode dieser Substanzen verweise ich auf die Mitteilung (Takata, 1936).

Im 1. Fall von mit hämolysiertem Blut injizierten Hunden tritt eine wesentlichere Verminderung dieser Substanzen in Milz und Leber als bei normalen Hunden ein. Setzt man den Gehalt dieser Substanzen in den Organen des normalen Hundes 100 g, so beträgt derselbe des injizierten, Lipoid-P: in Milz und Leber

6,5%; Lipoid-N: in der Leber 38%, in der Milz 15%; Lipoid-NH₂-N: in der Leber 62,8%, in der Milz 14,3%. Im 2. Fall von mit hämolysiertem Blut injizierten Hunden tritt eine mässige Verminderung der Substanzen ausser einer Vermehrung von Lipoid-NH₂-N in der Leber ein, und die Verminderung des Lipoid-P in der Milz ist besonders ersichtlich. Setzt man den Gehalt dieser Substanzen in den Organen des normalen Hundes 100 g, so beträgt derselbe des injizierten, Lipoid-P: in der Leber 73,9%, in der Milz 20%; Lipoid-N: in der Leber 75,3%, in der Milz 84,6%; Lipoid-NH₂-N: in der Leber 197,7% in der Milz 85,7%.

TABELLE I.

Material	Gew. d. Organ g	Wasser- gehalt %	Lipoid-P %	Lipoid-N %	Lipoid- NH ₂ -N %	
normal- Hund (♀) 7 kg	Leber	216	71,4	0,153	0,150	0,043
	Milz	43,5	77,3	0,110	0,130	0,042
injiziert- Hund Nr. 1 (♂) 6 kg	Leber	117		0,0099	0,057	0,027
	Milz	58,0		0,0072	0,020	0,006
injiziert- Hund Nr. 2 (♂) 6,5 kg	Leber	277	78,4	0,113	0,113	0,085
	Milz	45,0	79,7	0,022	0,110	0,036

Über die Menge von Lipoid-NH₂-N in Milz und Leber bei normalen Hunden existiert gar keine Literatur, und nach der Untersuchung an frischen Organen des gesunden Menschen von Epstein u. Lorenz (1930, 1932) beträgt Lipoid-N in der Leber 0,214% und in der Milz 0,149%. Bezüglich der Menge des Phosphatides in Leber und Milz bei normalen Menschen, Hunden, Kaninehen verweise ich Tabelle II.

Man darf freilich nicht ohne weiteres die Ergebnisse miteinander vergleichen, weil sie sich je nach der Untersuchungs-

TABELLE II.

Versucher	Tierarten	Lecithin auf frische Organ (%)	
		Milz	Leber
Brahn u. Pick (1927)	Mensch	1,82	
Rewald 28)	Hund	2,04	1,65
"	Rind	2,29	3,55
Kawano (1936)	Kaninchen	1,43	2,50
Koyanagi (1938)	"		3,68
Kan (1939)	Hund	2,90	4,02

methode und den Versuchstierarten immer anders erweisen. Wenn ich aber die Menge des Lipoid-P in meiner Untersuchung als Lecithin ($\text{Lipoid-P} \times 26,3$) rechne, enthält die Milz 2,90% Lecithin und steht den Ergebnissen von Rewald (1928) (vgl. unten) näher. Gleicherweise gerechnet, enthält die Leber nun 4,02% Lecithin und steht den Ergebnissen von Rewald (1928) bei Rindern und von Koyanagi (1938) bei Kaninchen näher. Wenn ich, wie oben, Lipoidphosphor in der Milz in Lecithin umrechne, so beträgt das Lecithin bei normalen Hunden 2,90%, im 1. Fall von mit hämolyisiertem Blut injizierten Hunden 0,189% und im 2. Fall 0,578%, eine deutliche Verminderung bei injizierten Hunden. Über die Untersuchung des Phosphatides in Milz und Leber unter den besonderen Bedingungen gibt es wenig Literatur ausser der Untersuchung bei Gaucher'scher und Niemann-Pick'scher Krankheit. Und Rewald (1928) hat die Hunde eine lange Zeit (6-8 Monate lang) mit der eine grosse Menge von Phosphatid enthaltenden Fütterung ernährt und die Vermehrung des Phosphatides in Hirn, Niere, Leber und Milz konstatiert.

Die bedeutende Verminderung von Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N nach der Injektion des hämolyisierten Blutes, und zwar die besonders grosse Verminderung in der Milz, ist wahrscheinlich auf die durch Verarbeitung des Hämoglobins im hämolyisierten Blut herbeigeführte Funktionsverwandlung von Leber und Milz zurückzuführen, wobei das entladene Phosphatid lebhaft ins zirkulierende Blut hineingeschickt wird. So sehe ich

zum Schluss, dass obige Ergebnisse den Zusammenhang zwischen Hämoglobinumsatz und Phosphatidumsatz in der Milz, einleuchtend erklärt haben.

LITERATUR.

- Epstein u. Lorenz (1930): Hoppe-Seyler's Z., 192, 145.
" " (1932): Hoppe-Seyler's Z., 211, 217.
Kan (1939): J. Biochem., 31, 61.
Koyanagi (1938): J. Biochem., 28 (Nr. 3), 371.
Kawano (1936): Nippon-Fujinka-Zassi, 31, 2740.
Rewald (1928): Biochem. Z., 198, 103.
Takata (1936): J. Biochem., 24 (Nr. 2), 153.

STUDIES ON N-GLYCOSIDES.

II. N-glucosides of Aniline Derivatives, and Anilides of Various Sugars.

By

KENZI HANAOKA.

*(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College.
Director: Prof. N. Ariyama)*

(Received for publication, Dec. 11, 1939)

In the previous communication (1938) the velocities of acid hydrolysis of the condensation products of glucose with isomeric toluidines and xyloidines were studied. It was found that the number and the position of the methyl group in the molecules of aglucones exerted marked influence on the rate of the hydrolysis; the susceptibility to hydrolysis increased with the number of the methyl group and also with the distance of the group from the amino group.

With the object of furthering our knowledge in this direction, the variety of N-glycosides was increased in the present experiments. Thus glucose was condensed with aniline derivatives, which had various groups other than the methyl group in their molecules, on the one hand; and anilides of various sugars were synthesized on the other. By means of these N-glycosides, it was intended to elucidate the effect of the chemical structure of aglycones and sugars on the resistance of glycosidic unions against hydrolysis by acid.

EXPERIMENTAL.

I. *Synthesis of N-glycosides.*

The procedure of the synthesis of N-glycosides followed the lines prescribed in the first communication. About 10 gm. of sugars were mixed with aglycones at the ratio of 1:2 mols. and

the mixtures were heated in 80 gm. of absolute ethyl alcohol under the reflex condenser until the sugars dissolved completely. The solutions were then treated with norit if they turned brown on heating, and concentrated to 1/2 or 1/3 volumes in vacuo at 40°C. Upon leaving the solutions in the ice chest, the glycosides crystallized out gradually. When the crystallisation was delayed, ether was added to the solutions until turbidity began to occur, then they were warmed again until the solutions became clear, and settled in the ice box. The crude samples were repeatedly recrystallized from absolute alcohol.

The N-glycosides synthesized were as follows: Glucosides of aniline, *o*-aminophenol, *o*- and *p*-toluidine, *o*- and *p*-anisidine, *o*- and *p*-phenetidine, *o*- and *p*-chloraniline, *o*- and *p*-aminobenzoic acid, *o*-aminobenzoic acid ethylester, and α - and β -naphthylamine; anilides of *d*-mannose, *d*-galactose, 2-methylglucose, 6-methylglucose, *n*-tetramethylglucose, lactose, maltose, *d*-xylose, *l*- and *d*-arabinose, and *l*-rhamnose; piperidides of glucose, *n*-tetramethylglucose, mannose, galactose, and *d*-arabinose. Among these glycosides the following compounds have not been reported in literature so far as the present writer knows: glucosides of *p*-aminobenzoic acid, *o*- and *p*-chloraniline, *o*-aminobenzoic acid ethylester, and β -naphthylamine; anilides of 2- and 6-methylglucose, and *d*-arabinose; piperidides of mannose, galactose, *n*-tetramethylglucose and *d*-arabinose. The properties of these new compounds are summarized in Table I. The physical constants of the other N-glycosides were practically identical with those described in literature, except the anilides of *l*-arabinose and disaccharides. The *l*-arabino-side prepared by Hermann (1905) was lemon yellow needle-shaped crystals, FP 103.5–106°C, and it rapidly became turbid in an alcoholic solution. The sample synthesized by the present writer was white needles, FP 126°, $[\alpha]_D^{20} - 37.0^\circ \rightarrow +2.5^\circ$ in methyl alcohol, and the nitrogen content was 6.25% (the theoretical value being 6.22%). Sorokin (1888) prepared crystalline lactosanilide, which had $[\alpha]_D - 14.19^\circ$; and also maltosanilide as a glassy mass. The lactosanilide of the present writer was identical with that of Sorokin. Maltosanilide was hygroscopic white needles, $[\alpha]_D^{20}$

TABLE I.
Physical Constants of New N-Glycosides.

Substance		Crystal- form	Melting- point (uncorr.)	Solubility				[α] _D ²⁰ (1%, 2 dm, methanol)	N content (Dumas)	
Sugar	Aglycone			Methanol	Ethanol	Ether	Water		Found (%)	Calcd. (%)
Glucose	<i>o</i> -Chlor- aniline	White needle	137°	++	++	—	+	—50.5° +5.0°	4.76	4.83
Glucose	<i>p</i> -Chlor- aniline	White needle	126°	++	++	—	++	—40.0° —22.5°	4.74	4.83
Glucose	<i>o</i> -Aminobenzoic acid ethylester	White needle	137°	++	++	—	+	+5.0°	4.06	4.05 (1 mol. H ₂ O)
Glucose	<i>p</i> -Amino- benzoic acid	White needle	127°	++	++	—	+	—112.0° —51.5°	4.41	4.41 (1 mol. H ₂ O)
Glucose	α -Naphthyl- amine	White needle	92°	++	++	—	+	—86.5° —58.0°	4.27	4.33 (1 mol. H ₂ O)
2-Methyl- glucose	Aniline	White needle	161°	++	+	+	+	—106.6° +28.3°	5.21	5.20
6-Methyl- glucose	Aniline	White needle	130°							
<i>d</i> -Arabinose	Aniline	White platelet	130°	++	++	—	+	+34.0° +2.5°	6.13	6.22
Mannose	Piperidine	White platelet	116–117°	++	+	—	++	—17.5° +12°	5.42	5.66
Galactose	Piperidine	White platelet	129°	++	+	—	++	+10° —3.5°	5.51	5.66
<i>n</i> -Tetramethyl- glucose	Piperidine	White needle	74°	++	+	+	+	+91.7°	4.01	4.62
<i>d</i> -Arabinose	Piperidine	White needle	103–104°	++	+	—	++	—20° —5.0°	6.42	6.45

+76.5° in water, N content 3.31% (theor. 3.35%) and melted at 90°–100°C under decomposition. The purity of the maltosanilide was examined in the following way: 100.0 mg of the anilide were dissolved in 10 cc. of 0.1 N sulphuric acid solution, and the change of the rotatory power of the solution was followed at intervals. The temperature was 20°C. The length of the tube was 1 dm. α was +0.79° at 0 time, +1.05° after 30 minutes, and remained constant at this value, showing the complete hydrolysis of the anilide. Calculating from this value, the maltose which was liberated from the anilid, had $[\alpha]_D + 126.8^\circ$. Since pure maltose has $[\alpha]_D + 129.0^\circ$, the maltosanilide sample may be regarded as virtually pure.

All the N-glycosides were hydrolyzed by acid with great ease. The mutarotation of the compounds was much influenced by a trace of acid, equilibria being established quickly. In methanol the N-glycosides remained unchanged at the equilibria thus established for a few days. In neutral methylalcoholic solutions the equilibria were reached slowly after several hours or after a day. Weygand (1939) observed recently that the crystalline *p*-toluidineglucoside decomposed within a few hours when a drop of acetic acid was present in the desiccator.

Attempts to accomplish the condensation of glucose with pyrrol, α - and β -methylindol, phthalimide and isatine were without success under the conditions of the present experiments. The imino compounds, in which molecules the hydrogen atom of the imino group is mobile, seem not to condense with sugars. However, it may be possible for pyrrol to react with sugars when both substances are fused together. Plissow (1929) stated that he had obtained such a compound. Secondary amines did not combine with sugars under the present experimental conditions.

II. Method of measuring hydrolysis.

The hydrolysis of the N-glycosides was determined from the change of the rotatory power of the solutions to be tested. For this purpose, 2 cc. of 0.1 N sulphuric acid solution were added to 10 cc. of the absolute methylalcoholic solutions of the substances

after the rotatory power had reached constant values (mutarotation), and then the hydrolysis was followed at intervals with the polarimeter. Control experiments showed that the N-glycosides, except piperidides, were practically stable and did not change the rotatory power in the mixture of methanol and water which was used instead of acid, so long as the time was not prolonged over several hours. The concentration of the substances in absolute methylalcohol was 0.036 mol in glucosides of aniline derivatives, and 0.0196 mol in anilides of various sugars. The length of the polarimeter tube was 1 dm. The temperature was 22–23°C. The rotatory power of 63.0 mg of equilibrated glucose, which were the amount of sugar to be liberated at the complete hydrolysis of 10 cc. of 0.036 mol solutions, was measured under the same conditions as those of the main experiments, and this value was taken as the basis for calculation of the percentages of hydrolysis in the cases of glucosides of substituted anilines. This basal value of the rotatory power was +0.29° at 22–23°C. The hydrolysis of anilides of other sugars was determined on the same principle.

III. Hydrolysis of N-condensation products of glucose with aniline derivatives.

It will be seen from Table II that the introduction of various groups into the ortho-position of the molecule of aniline exerted varying influences on the N-glucosidic unions. Aminophenol-glucoside was most sensitive to hydrolysis. The substitution of the hydroxyl group by a methoxy or ethoxy group decreased the susceptibility. Thus anisidine- or phenetidineglucoside was hydrolyzed more slowly than the glucoside of aminophenol. There was no marked difference in the velocity of hydrolysis between anisidine and phenetidine. The presence of a methyl group was of less consequence than that of the groups mentioned above. Yet, toluidide was still more sensitive than anilide. Chloranilide showed a greater resistance to hydrolysis than anilide. N-glucoside of aminobenzoic acid was not hydrolyzed at all under the experimental conditions. The results mentioned above seem to indicate that the susceptibility of the glucosidic unions varies with the

TABLE II.
Hydrolysis of N-Glycosides of ortho-Substituted Anilines.

Aglycone of N-glycoside	Time							
	0 min.		30 min.		60 min.		90 min.	
	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)
Aniline	-0.42°	0	-0.37°	7.0	-0.32°	14.1	-0.27°	21.1
<i>o</i> -Aminophenol	-0.28°	0	-0.12°	28.1	-0.00°	49.2	+0.05°	57.9
<i>o</i> -Phenetidine	-0.32°	0	-0.22°	16.3	-0.15°	27.9	-0.10°	36.1
<i>o</i> -Anisidine	-0.33°	0	-0.23°	16.1	-0.16°	27.4	-0.10°	37.1
<i>o</i> -Toluidine	-0.36°	0	-0.29°	10.8	-0.23°	20.0	-0.18°	27.7
<i>o</i> -Chloraniline	-0.08°	0	-0.06°	5.4	-0.05°	8.1	-0.05°	8.1
<i>o</i> -Aminobenzoic acid	-0.13°	0	-0.13°	0	-0.13°	0	-0.13°	0

degree of dissociation of aglucones; the aniline derivative which has a larger dissociation constant as a base, forms N-glucoside with higher susceptibility.

As shown in Table III, the N-glucosides of para-substituted anilines were hydrolyzed in the same order as those of the ortho-series. The susceptibility toward hydrolysis decreased in the following order: anisidide or phenetidide, toluidide, anilide, and then chloranilide. The glucoside of *p*-aminobenzoic acid was not hydrolyzed under the conditions of the present experiments. The difference between the ortho- and the para-series was in a higher susceptibility of the latter over the former.

The hydrolysis of the N-glucosides of *o*- and *p*-aminobenzoic acids was performed at a higher acidity. It is indicated in Table IV that the glucosides were then hydrolyzed at different velocities. Contrary to expectations, the *o*-compound was found to be more sensitive than the *p*-compound. The esterification of the carboxylic group of the *o*-acid increased the susceptibility of the glucosidic linkage toward hydrolysis. It will be recalled in this connection that Kobayasi (1938) pointed out similar, exceptional behaviours of aminobenzoic acids in the reactions between amino acids and methylglyoxal. He found that the greater the distance between amino and carboxyl groups in molecules of amino acids, the easier the reaction of methylglyoxal with the amino group, while aminobenzoic acids were exceptions; *o*-acid reacted with methylglyoxal at a higher velocity than *p*-acid.

Table V shows that the glucoside of α -naphthylamine was slightly less resistant to hydrolysis than that of β -compound. There was no marked difference in the influence of the benzene- and the naphthalene-nucleus on the firmness of linkages between glucose and the amino groups which were attached to the nuclei.

IV. Hydrolysis of anilides of various sugars.

The condensed summary of the results is given in Table VI. The stability of the glycosidic unions decreased in the following order: *l*-rhamnoside, *d*-arabinoside, *l*-arabinoside, and *d*-xyloside in pentosanilides; glucoside, mannoside, and galactoside in hexos-

TABLE IV.
Hydrolysis of N-Glycosides of Aminobenzoic Acids.

Aglycone	Time					
	0 min.		30 min.		60 min.	
	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)
<i>o</i> -Aminobenzoic acid	-0.15°	0	-0.08°	15.6	-0.03°	26.7
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	-0.39°	0	-0.33°	8.1	-0.28°	14.9
<i>o</i> -Aminobenzoic acid ethylester	-0.04°	0	+0.03°	20.6	+0.07°	32.4
					+0.02°	37.7
					-0.24°	20.8
					+0.12°	47.1

TABLE V.
Hydrolysis of N-Glycosides of Naphthylamines.



Naphthylamine	Time					
	0 min.		30 min.		60 min.	
	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)
α -Compound 	-0.55°	0	-0.48°	8.2	-0.41°	16.7
β -Compound 	-0.61°	0	-0.55°	6.7	-0.50°	12.2
					-0.35°	23.8
					-0.45°	17.8

TABLE VI.
Hydrolysis of Anilides of Various Sugars.

Sugar	Time						
	0 min.		30 min.		60 min.		90 min.
	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	
<i>d</i> -Xylose	-0.07°	0	+0.02°	70.0	+0.06°	100	
<i>l</i> -Arabinose	+0.04°	0	+0.18°	63.6	+0.24°	90.9	+0.26° 100
<i>d</i> -Arabinose	+0.00°	0	-0.11°	42.3	-0.16°	61.5	-0.21° 80.8
<i>l</i> -Rhamnose	+0.36°	0	+0.30°	28.6	+0.24°	57.1	+0.20° 76.2
<i>d</i> -Galactose	-0.19°	0	-0.02°	47.2	+0.11°	83.3	+0.14° 91.7
<i>d</i> -Mannose	-0.24°	0	-0.14°	33.3	-0.09°	50.0	-0.05° 63.3
<i>d</i> -Glucose	-0.19°	0	-0.14°	14.3	-0.09°	28.6	-0.04° (120 min.) 42.9
Malrose	+0.51°	0	—	—	+0.55°	18.2	+0.59° (120 min.) 36.4
Lactose	-0.16°	0	—	—	-0.10°	10.0	0.05° (120 min.) 18.3

TABLE VII.
Hydrolysis of Anilides of Methylglucoses.

Sugar	Time							
	0 min.		30 min.		60 min.		90 min.	
	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)	Rotation	Hydrolysis (%)
6-Methylglucose*1	-0.17°	0	-0.13°	11.1	-0.09°	22.2	-0.05°	33.3
2-Methylglucose*2	+0.12°	0	—	—	+0.15°	15.0	—	—
α -Tetramethylglucose*2	+0.25°	0	—	—	+0.25°	0	—	—
							+0.18°	30.0
							+0.25°	0

*1 2 cc. of 0.1N sulphuric acid solution were added to 10 cc. of methylalcoholic solutions of glucosides.

*2 2 cc. of 1N sulphuric acid solution were used.

anilides; lactosides, and maltoside in anilides of disaccharides.

Methylglucosanilides showed distinctly different degrees of resistance toward acid hydrolysis according to the position and number of the methyl group in the molecule of glucose. It will be seen in Table VII that 6-methylglucosanilide was slightly more stable than the ordinary glucosanilide, while 2-methyl- and *n*-tetramethylglucosanilides were not hydrolyzed at the acidity of the present experiments. Employing 1 N sulphuric acid solution in substitution for 0.1 N solution, 2-methylglucosanilide was hydrolyzed 15% after 60 minutes and 30% after 120 minutes, but *n*-tetramethylglucosanilide was still stable under this condition. It can be concluded that the presence of the methyl group increased the stability of the glucosidic unions of methylglucosanilides, and that the action of the group became more marked with the approach of the group to C₁ of the glucose molecule and with the increase of the number of the group.

V. Piperidine-N-glucosides.

Piperidides of various sugars, such as glucose, mannose, galactose, *n*-tetramethylglucose and arabinose were very unstable. They were hydrolyzed to considerable extents in the mixture of methanol and water. The rapid increase of basicity which was caused by the liberation of piperidine made it impossible to determine accurately the velocity of the hydrolysis.

SUMMARY.

1. N-condensation products of glucose with various aniline derivatives were synthesized, and the influence of the structure of aglucones on the hydrolysis of the glucosidic linkages by acid was studied. The introduction of hydroxyl, methoxy, ethoxy and methyl groups decreased the stability of the linkages, while chlorine, especially the carboxylic group increased the stability.

2. Anilides of various sugars showed different degrees of resistance toward hydrolysis by acid. The susceptibility became greater in the following order: lactoside, and maltoside in the anilides of disaccharides; glucoside, mannoside, and galactoside in

hexosanilides; *l*-rhamnosides, *d*-arabinoside, *l*-arabinoside, and *d*-xyloside in pentosanilides. In methylglucosanilides the resistance increased with the approach of the methyl group to C₁ of the glucose molecule and with the increase of the number of the group.

REFERENCES.

- Hanaoka, K. (1938): J. Biochem., **28**, 109.
Hermann, P. (1905): Chem. Zbl., I, 1314.
Kobayasi, S. (1938): J. Biochem., **27**, 107.
Plissow, A. (1929): Chem. Zbl., I, 2884.
Sorokin, B. (1888): J. prakt. Chem., **37**, 291.
Weygand, F. (1939): Ber. deutsch. chem. Ges., **72**, 1663.

BIOCHEMISCHES STUDIUM ÜBER DAS CHAULMOOGRAÖL.

Über die Ausscheidung des Chaulmoograöls im Harn des
mit Chaulmoograöl injizierten Kaninchens.

VON

JÖKITI KOYANAGI.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Medizinischen Fakultät,
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1939)

Das Chaulmoograöl besteht hauptsächlich aus dem Glycerid von Chaulmoograsäure und Hydnocarpussäure, beiden so seltenen cyclischen Fettsäuren, die freilich im Tierkörper nicht zugegen, stark polarisierbar und gegen den Tierkörper giftig sind. Es ist biochemisch interessant, die Frage zu lösen, was für einen Einfluss denn die Injektion des solcherart charakteristischen Chaulmoograöls auf das Tier ausübt, und für welches Schicksal dann das dem Tierkörper zugeführte Chaulmoograöl bestimmt ist. Das kann, in Hinsicht auf die klinische Anwendung desselben bei Leprösen als eines einzigen Heilmittels, der Therapie eine wichtige Grundkenntnis beibringen. Trotzdem wurde aber in dieser Richtung die Untersuchung noch nicht fortgeführt, was mich dazu veranlasste, zunächst über die Ausscheidung des Chaulmoograöls im Harn des Tiers ein Experiment auszuführen, um zu erforschen, ob das dem Körper zugeführte Chaulmoograöl als solches, also nicht abgebaut, ausgeschieden wird, was der Untersuchung über den Umsatz des mit Chaulmoograöl injizierten Tierkörpers einen grundlegenden Beitrag gäbe.

EXPERIMENT.

Man injiziert dem Kaninchen intravenös eine bestimmte Menge von Emulsion des Chaulmoograöls und misst die Menge von im innerhalb 24 Stunden durch den Katheter entnommenen Harn

ausgeschiedenen, gesamten Fettstoffe und des Chaulmoograöls.

A. *Reinigung des Chaulmoograöls und Herstellung der Emulsion.*

a) *Reinigung des Chaulmoograöls:* Man fügt dem frischen Chaulmoograöl aktivierte Kohle in Mengen von 5% zu, schüttelt etwa eine Stunde, lässt es einige Stunden lang stehen, filtriert es, fügt die doppelte Menge Reinalkohol hinzu, schüttelt eine Zeit lang, lässt es stehen und dekantiert den Obersatz. Nach Wiederholung dieses Verfahrens fängt man die Ölschicht auf, löst im Äther auf, entfernt Wasser durch Natriumsulfat, filtriert und vertreibt den Äther durch Minderdruck. Das so behandelte Chaulmoograöl ist nahezu farblos und neutral; die Säurezahl=0,29 (nach der Reinigung) und =2,61 (vor der Behandlung), $[\alpha]_D^{20} = +54,4^\circ$, die Jodzahl=88, der Gehalt des Glyzerids der cyclischen, ungesättigten Fettsäure beträgt, nach meiner später zu erwähnenden Methode gemessen, 97%.

b) *Herstellung der Emulsion:* Ich stellte eine Emulsion her, indem ich durch Anwendung von Protalbinsauresnatrium Fettstoffe dispergierte.

Herstellungsweise des Protalbinsauresnatriums: Nach Tabayasi'scher Methode (1935) stellte man Protalbinsauresnatrium folgendermassen dar. Das unter der Minderwärme vertrocknete Eierweiss zerreibt man zu Mehlfeinheit, fügt 1 n-NaOH zu, vermischt sorgfältig, hält es eine Stunde lang bei 80° , filtriert nach der Abkühlung; es entsteht eine klare braune Lösung, aus welcher durch Ansäuerung mit Essigsäure eine grosse Menge Niederschlag hervorgerufen wird. Dies lässt man eine Nacht lang bei Zimmertemperatur stehen, wäscht nach Filtrierung den Niederschlag mit einer kleinen Menge Wasser, dialysiert ihn elektrisch, bewirkt Niederschlag durch Hinzufügung von Alkohol, entfernt den Alkohol, fügt bei Anreibung im Mörser n/2-NaOH nur portionsweise hinzu, bis sich eine schwache Alkalität zeigt, bewirkt wieder durch Hinzufügen einer grossen Menge Alkohols die Fällung, filtriert sie ab, wäscht sie genügend mit Alkohol, wäscht dann mit Äther und trocknet sie im Exsikkator unter Niederdruck.

Das solcherweise dargestellte protalbinsaure Natrium ist ein etwas gelbliches Pulver, das im Wasser löslich und schäumend ist. Es zeigt bei Anstellung der Biuretreaktion eine purpurrote Farbe. N-Menge beträgt 14%, NH_2 -N-Menge 0,57% und Goldzahl 0,125. Das bei der Goldzahlbestimmung angewendete Goldsol ist rot und klar, dessen winzige, gleichmässig disperse Teilchen man unter dem Ultramikroskop beobachten kann.

Herstellungsweise der Emulsion des Chaulmoograöl. Als Beispiel wird hier die Herstellungsweise der 50 ccm Emulsion des 5%igen Chaulmoograöls erwähnt: man fängt 2,5 g Traubenzucker und 0,25 g Protalbinsauresnatrium in einen Mörser auf, reibt sie mit einer kleinen Menge Wasser so weit an, bis sie zähe wird, gibt mit einem Glasstab 2,5 g Chaulmoograöl tropfenweise in den Mörser, reibt es mit kleiner Menge Wasser genügend an, regelt das Abtropfen von Öl und Wasser, sodass beim Anreiben stets eine knisternde Zähigkeit erhalten bleibt; man emulgiert sorgfältig und möglichst lange. Nach Zufügung des 2,5 g Öls verdünnt man die Emulsion unter ständigem Anreiben mit warmem Wasser auf 50 ccm und schüttelt heftig. Entdeckt man unter dem Mikroskop grob. disperse Fetteilchen eingemischt, so zentrifugiere man sie 30 Minuten lang mit einer Zentrifuge von 2000 Umdrehungen, entferne den Obersatz, filtriere durch entfettete Watte und bringe nach 5 minutigem Kochen in Gebrauch. Die also hergestellte Emulsion enthält 5% Chaulmoograöl, 0,5% Protalbinsauresnatrium und 5% Traubenzucker. Solche Emulsion erhält sich lange Zeit in ihrem emulgierten Zustand, vermischt sich leicht mit Wasser, sie ist pH 6,996. Ihre Fetteilchen dispersieren sich ganz fein und sind meistens weit kleiner als 1μ . Hierin vermischen sich keine groben Fetteilchen, die grösser als $2-3\mu$ sind. Die intravenöse Injektion der grossen Dosis der 5% Emulsion wie 20 ccm pro kg Körpergewicht ruft keine Fettembolie in der Lunge hervor und verursacht nur selten Hämolyse, die geringgradige Hämoglobinurie zur Folge hat. Aus der Untersuchung in vitro über die Hämolysität der Emulsion des 5%igen, neutralen Chaulmoograöls ergibt sich, dass die Vermischung von 10fach verdünnter Suspension der Blutkörperchen des Kaninchens und der Emulsion zu

gleichen Teilen gar keine Hämolyse hervorruft, und dass zwar in der 5%igen Emulsion sich gesunkene Erythrocyten dunkelrot verfärben, aber in der unter 2,5% verdünnten Emulsion keine Farbveränderung auftritt. Ferner ergibt sich aus der Untersuchung der Hämolysefähigkeit des in der physiologischen Kochsalzlösung gelösten Protalbinsaurennatriums, dass erst in der Vermischung von 1,0% Lösung mit 10fach verdünnter Suspension der Blutkörperchen des Kaninchens sich die Blutkörperchen in Spuren hämolysieren, wobei aber gesunkene Blutkörperchen sich nicht verfärben, sondern hellrot bleiben. Aus obigen Experimenten ergibt sich, dass die hämolysierende Kraft der Emulsion des 5%igen, neutralen Chaulmoograöls im Lebewesen auf das die Oberflächenspannung herabsetzende Protalbinsauresnatrium zurückzuführen ist, und aus der Hämolyseprüfung in vitro ergibt sich, dass die Farbveränderung des Hämoglobins nicht auf der Wirkung von Protalbinsaurennatrium, sondern auf der des Chaulmoograöls selbst beruht.

B. Bestimmungsmethode des Chaulmoograöls.

Ich beabsichtigte, bei Kaninchen nach intravenöser Injektion einer bestimmten Menge Emulsion des 5%igen Chaulmoograöls die gesamte Menge der Fettstoffe und des Chaulmoograöls im Harn innerhalb 24 Stunden zu messen. Da zur Bestimmung des Chaulmoograöls in Fettstoffen bis jetzt keine Methode vorgeliegt, sah ich mich veranlasst, zuerst nach einer geeigneten Bestimmungsmethode zu suchen. Es scheint mir, dass das Chaulmoograöl nach Natzukow (1904) mit Formol eine Fällung (sog. Formolit) gibt, weil das Öl ein Glyzerid von Chaulmoograsäure und Hydnocarpusäure ist, und diese Fettsäuren cyclisch sind. Nach meinem Experiment ist mit einer geeigneten Menge konzentrierter Schwefelsäure und Formol eine Fällung entstanden, die sich in Wasser und Fettlösungsmitteln nicht auflöst. Mit verschiedenen tierischen Fettstoffen geben diese Reagenzien keine Fällung, aber mit Cholesterin entsteht eine Fällung, die, weil sie sich im Fettlösungsmittel auflöst, von Chaulmoograöl-Formolit zu trennen ist. Formolit aus den Fettstoffen im Harn erweist sich also charakteristisch für

Chaulmoograöl und lässt sich nach dem folgenden Verfahren quantitativ bestimmen, deshalb kann dieses Verfahren als Bestimmungsmethode des Chaulmoograöls empfohlen werden.

Die Ausführung dieses Verfahrens ist folgende. Man fängt das Chaulmoograöl in ein Spitzglas auf, gibt unter Kühlung die gleiche Menge konzentrierter Schwefelsäure tropfenweise aus der Mikrobürette hinzu, vermischt sorgfältig, fügt dann 35% Formol dazu, halb so viel, wie die konzentrierte Schwefelsäure beträgt, zerstösst die entstandene Fällung staubfein, fügt dazu starkes Ammoniak-Wasser soviel, dass alles eine eigelbe Färbung annimmt, filtriert im Gooch-Ziegel mit Asbest, wäscht genügend mit Wasser, warmem Aceton und Äther, trocknet so weit, dass die Menge bei 60° konstant bleibt, und misst die Menge. Multipliziert man den gemessenen Wert mit $\frac{4}{5}$, so erhält man die Menge des Chaulmoograöls. Das Ergebnis der Messung ist folgende: Man verwendete 0,025 g, 0,05 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g von dem, nach oben erwähneter Methode raffinierten Chaulmoograöl und konnte den Wert vom Maximum 101,8%, Minimum 95,4% und Durchschnitt 97,2 bestimmen. Da die freien Fettsäuren und deren Ethylester mit Formolit nichts zu tun haben, so wird hier nur das unveränderte Chaulmoograöl bestimmt. Diese Bestimmungsmethode kann auch zur Prüfung der Reinheit des Chaulmoograölspräparates verwendet werden. Versuchsweise habe ich dann nach der obigen Methode das Chaulmoograöl im Harnfett bestimmt. Eine bestimmte Menge Chaulmoograöl (0,025 g, 0,05 g, 0,1 g) wird mit 0,05 g Olivenöl, 0,1 g Lecithin, 0,01 g Cholesterin vermischt, mit dem frischen, durch Essigsäure neutralisierten Harn des Kaninchens emulgiert, in den Flüssigkeitsextrakter aufgefangen und mit Äther ausgezogen. Verwendet man die obige Bestimmungsmethode auf die solcherweise extrahierten Fettstoffe, so kann man den Wert des Chaulmoograöls vom Maximum 102,4%, Minimum 91,6% und Durchschnitt 98,0% bestimmen. Also kann man diese Methode für das Experiment der Ausscheidung des Chaulmoograöls in den Harn verwenden.

Die Ausführungsmethode ist folgende: Die gesamte Menge des frischen mit dem Katheter entnommenen Harns des Kaninchens

neutralisiert man mit Essigsäure, trägt ihn als bald in den Flüssigkeitsextrakter über und extrahiert 24 Stunden lang mit Äther. Die Extraktionsflüssigkeit wird in den Kjeldahlkolben (100 ccm) übertragen, wird nach vollständiger Verteilung von Äther und Wasser unter Minderdruck mit wasserfreiem Äther extrahiert, durch Asbestfilter filtriert, im Kakiuchi'schen Vakuumdestillator (1911) 3 Stunden lang gekocht, um das in die Harnfettstoffe eingemischte Phenol zu beseitigen, und dann gemessen. Diese Fettstoffe werden mit einer kleinen Menge von wasserfreiem Äther in ein Spitzglas übertragen und nach vollständiger Entfernung des Äthers der Bestimmungsmethode des Chaulmoograöls unterzogen.

C. Experimentelle Beobachtungen.

Erstes Experiment. Die Messung wird 3 Tage lang nach 1-maliger Injektion der 5%igen Emulsion 10 ccm pro kg Körpergewicht ausgeführt.

TABELLE I.

Kaninchen Nr.				1	2	3	4
Körpergewicht kg				1,735	1,500	1,690	1,380
injizierte Menge g				0,87	0,75	0,85	0,69
Versuchstag	1	Harn ccm		160	120	100	100
		Harnfett g		0,0013	0,0328	0,0004	0,0009
		Chaulmoograöl g		0	0,0170	0	0
	2	Harn ccm		195	175	140	150
		Harnfett g		0,0007	0,0006	0,0007	0,0019
		Chaulmoograöl g		0	0	0	0
	3	Harn ccm		110	125	150	120
		Harnfett g		0,0014	0,0006	0,0001	0,0037
		Chaulmoograöl g		0	0	0	0

Bemerkenswert ist, dass beim Kaninchen Nr. 2. 0,017 g Chaulmoograöl in 0,0328 g Harnfettstoffen im 24 stündigen Harn enthalten ist.

Zweites Experiment. Man injiziert täglich einmal 5% Emulsion 5 ccm pro kg Körpergewicht ununterbrochen 5 mal.

TABELLE II.

Kaninchen Nr.				5	6	7	8
Körpergewicht		kg		2,350	1,750	1,880	1,880
Versuchstag	Vor Injektion	Injizierte Menge	g	0	0	0	0
		Harn	ccm	165	190	160	160
		Harnfett	g	0,0005	0,0009	0,0002	0,0006
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	1	Injizierte Menge	g	0,59	0,43	0,46	0,46
		Harn	ccm	225	245	210	180
		Harnfett	g	0,0011	0,0025	0,0003	0,0655
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0,0051
	2	Injizierte Menge	g	0,58	0,43	0,46	0,46
		Harn	ccm	200	130	200	200
		Harnfett	g	0,0011	0,0031	0,0004	0,0009
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	3	Injizierte Menge	g	0,58	0,44	0,45	0,46
		Harn	ccm	230	180	120	180
		Harnfett	g	0,0019	0,0013	0,0014	0,0007
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	4	Injizierte Menge	g	0,58	0,43	0,46	0,46
		Harn	ccm	205	165	145	165
		Harnfett	g	0,0028	0,0040	0,0005	0,0018
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	5	Injizierte Menge	g	0,58	0,43	0,46	0,48
		Harn	ccm	160	160	145	185
		Harnfett	g	0,0018	0,0035	0,0013	0,0037
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0

Beim Kaninchen Nr. 8. ist nach der ersten Injektion von 0,46 g Chaulmoograöl 0,0051 g Chaulmoograöl in 0,0655 g Harnfett enthalten. Das Aussehen des Harnfettes ist wachsartig wie Chaulmoograöl. Das kommt daher, dass der grösste Teil des Harn-

fettes sich als die Fettsäure des Chaulmoograöls erweist, weil sie nach dieser Methode keinen Niederschlag gibt. Alle übrigen Fällen sind negativ oder geben nur Spuren eines Niederschlages.

Drittes Experiment. Dasselbe Experiment wie das zweite; wurde bei jüngeren Kaninchen angestellt, wobei aber eine Ausscheidung des Chaulmoograöls in den Harn nicht konstatiert werden konnte.

TABELLE III.

Kaninchen Nr.				9	10	11	12
Körpergewicht kg				1,090	1,120	1,100	1,190
Versuchstag	Vor Injektion	Injizierte Menge	g	0	0	0	0
		Harn	ccm	70	125	170	170
		Harnfett	g	0,0004	0,0001	0,0002	0,0017
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	1	Injizierte Menge	g	0,29	0,29	0,28	0,30
		Harn	ccm	100	100	120	170
		Harnfett	g	0,0011	0,0007	0,0006	0,0015
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	2	Injizierte Menge	g	0,28	0,26	0,28	0,29
		Harn	ccm	120	60	170	180
		Harnfett	g	0,0004	0,0008	0,0017	0,0017
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	3	Injizierte Menge	g	0,28	0,26	0,28	0,29
		Harn	ccm	120	60	180	210
		Harnfett	g	0,0009	0,0016	0,0007	0,0013
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	4	Injizierte Menge	g	0,28	0,25	0,29	0,31
		Harn	ccm	120	50	180	130
		Harnfett	g	0,0008	0,0015	0,0030	0,0021
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0
	5	Injizierte Menge	g	0,28	0,27	0,28	0,30
		Harn	ccm	90	70	140	130
		Harnfett	g	0,0011	0,0017	0,0011	0,0016
		Chaulmoograöl	g	0	0	0	0

SCHLUSSFOLGERUNG.

Aus obigen Ergebnissen wird folgendes geschlossen:

Injiziert man intravenös eine grosse Dosis des Chaulmoograöls, so wird das Chaulmoograöl in einer Minderzahl der Fälle unverändert in den Harn mit Sicherheit ausgeschieden.

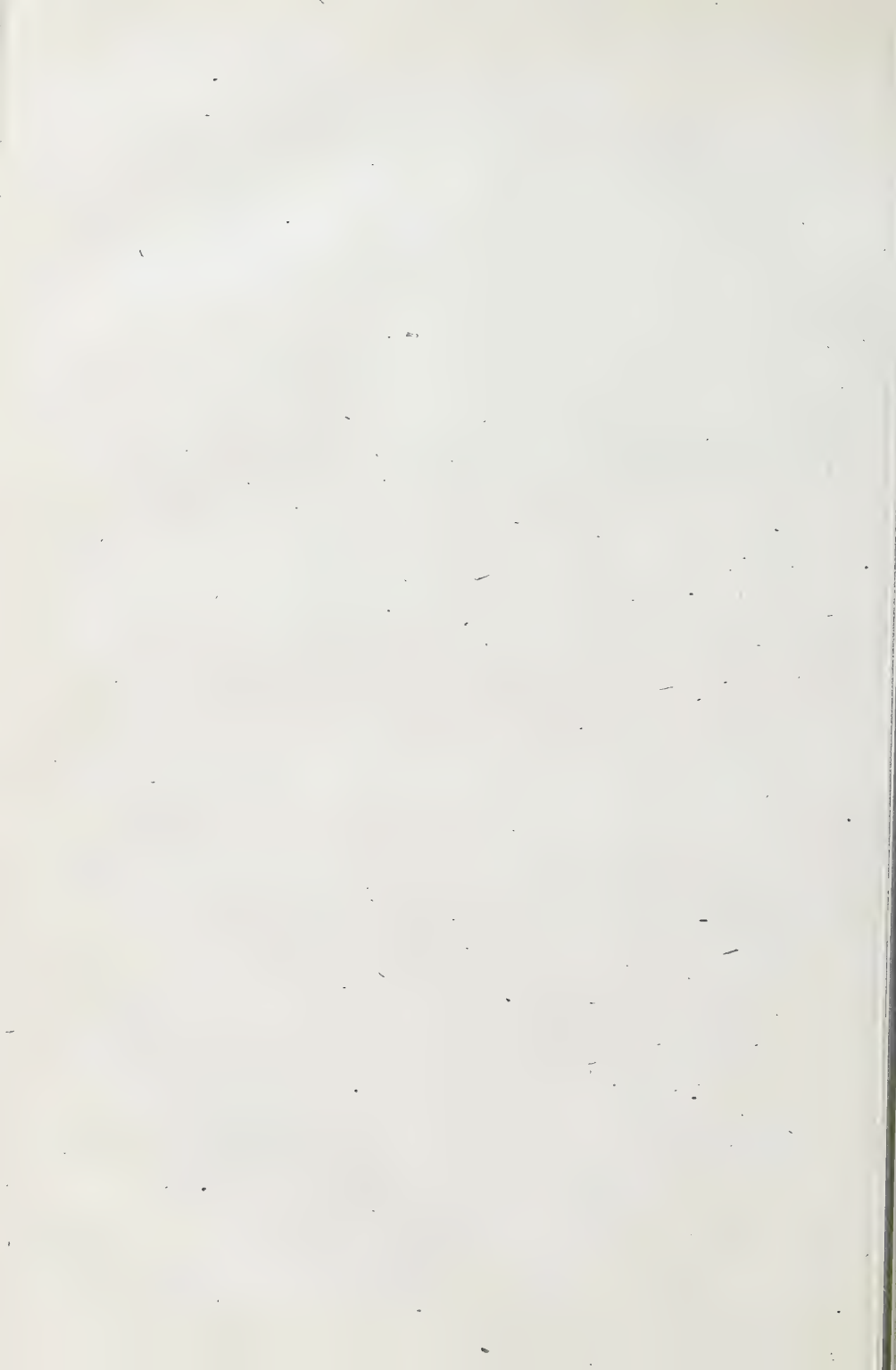
Bisher hat eine Bestimmungsmethode des Chaulmoograöls nicht vorgelegen. In dieser Mitteilung befürworte ich eine Bestimmungsmethode des Chaulmoograöls.

LITERATUR.

Kakiuchi (1911): Biochem. Z., 32, 137.

Natzukow (1904): Chem. Zentralbl., 2, 1042.

Tabayasi (1935): Tokyo Izi Sinsi, 2959, 47.



STUDIEN ZUR ZYMASEANALYSE.

VON

KICHINOSUKE SUGAYA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1939)

Kobayashi (1936) teilte mit, dass er aus dem wässrigen Extrakt von "Ebios", einem Trockenhefepräparat, durch Azetonzusatz zwei Fraktionen bekam, nämlich Fraktion I, die durch $\frac{1}{2}$ Volumen Azeton fällbar ist, und Fraktion II, die nach dem Abzentrifugieren der vorigen Fraktion weiter aus der überstehenden Lösung durch 3 Volumen Azetonzusatz gefällt wird und auf Brenztraubensäure stark decarboxylierend einzuwirken imstande ist.

Ich habe diese Versuche fortgesetzt und beobachtet, dass jede einzelne Fraktion an sich Fruktose nur äusserst schwach vergärt, aber dass, falls beide Fraktionen zusammengemischt auf Fruktose wirken, eine starke Gärung zu beobachten ist (Versuch 1). Dabei schwankt aber unvermeidlich die Induktionsdauer mehr oder weniger, was vielleicht durch verschiedene Zimmertemperatur bei der Darstellung der beiden Fraktionen verursacht wird. Fraktion I aus 2 g Ebios wog 0,15 g und enthielt 12,3% N, Fraktion II wog 0,2 g und enthielt 9,4% N.

Zuerst habe ich untersucht, wie die verschiedenen Hexosephosphorsäureester einerseits durch Fraktion I und II vergoren werden und wie die Anwesenheit des einzelnen Esters die Induktionsdauer der Fruktosegärung durch jene beiden Fraktionen beeinflusst wird. Da Acetaldehyd bekanntlich die Induktionsdauer der Zuckergärung verkürzt (Versuch 2), habe ich bei der Phosphorsäureestergärung auch den Einfluss des Acetaldehydzusatzes geprüft.

Hexosediphosphorsäure wird nicht, auch bei Anwesenheit des Acetaldehyds, vergoren, sie fördert aber die Fruktosegärung wie

Acetaldehyd (Versuch 3 A). Embdenester wird vergoren (Versuch 3 B); die Gasentwicklung beginnt dabei ohne erkennbare Induktionszeit sogleich, die Geschwindigkeit der Gärung ist aber langsam. Acetaldehyd übt dabei fast keinen Einfluss aus. Die Fruktosegärung beginnt bei Anwesenheit des Embdenesters sogleich nach Fermentzusatz. Neubergester und Coriester verhalten sich wie Embdenester (Versuch 3 C u. D). Der Coriester vergärt aber langsamer als andere Monoester und seine Anwesenheit verkürzt die Induktionsdauer der Fruktosegärung nicht besonders. Im grossen und ganzen verläuft der Zuckerabbau durch das Gemisch von beiden Fraktionen wie durch Trockenhefe. Wie oben erwähnt, bewirkt jede von beiden Fraktionen an sich keine Fruktosegärung. Deshalb habe ich Untersuchungen darüber angestellt, wie die Zymasekomponenten an beiden Fraktionen verteilt sind.

Es wurde erhitzte Lösung der Fraktion I hergestellt und mit Fraktion II gemischt. Durch dieses Gemisch wurde Fruktose selbst bei Anwesenheit von Acetaldehyd, Hexosediphosphat und $MgCl_2$ nicht vergoren. Dies zeigt, dass ein vollständiges Apozymasesystem in Fraktion II nicht enthalten ist. Carboxylase ist in Fraktion II vorhanden, daher ist das Gemisch der Fraktion I und der erhitzten Fraktion II-Lösung selbstverständlich nicht gärfähig.

Dann wurden Untersuchungen darüber ausgeführt, ob die Fraktion I instande sei, die Fruktose in irgendein Zwischenprodukt zu überführen, das weiter durch die Fraktion II vergoren wird. Nach einstündiger Einwirkung der Fraktion I auf Fruktose wurde die Versuchslösung erhitzt und mit Fraktion II versetzt. Gas-Entwicklung konnte nicht beobachtet werden (Versuch 4 A). Wenn aber die Fraktion I mit der erhitzten Fraktion II-Lösung zuerst auf Fruktose einwirkte und nach Erhitzung erneute Einwirkung der Fraktion II folgte, konnte eine nicht unbeträchtliche Gärung beobachtet werden (Versuch 4 B u. C). Zusatz von Hexosediphosphat blieb ohne Einfluss. Dieser Versuch zeigt, dass Überführung der Fruktose in ein Zwischenprodukt, das durch Fraktion II vergoren wird, einer Zusammenwirkung der Frak-

tion I und des thermostabilen Bestandteils der Fraktion II bedarf. Ich habe dieses Zwischenprodukt noch nicht chemisch untersucht. Als ein bekanntes Zwischenprodukt des Zuckerabbaus habe ich aber Phosphoglycerat gewählt und sein Verhalten gegenüber Fraktion I + II geprüft.

Phosphoglycerinsäure wird durch Fraktionen I + II fast in gleicher Geschwindigkeit wie der Coriester, also langsamer als der Neubergester vergoren (Versuch 3 E). Acetaldehyd oder Hexosediphosphatzusatz bleiben dabei ohne Einfluss. Bei alleiniger Einwirkung der Fraktion I oder II auf das Phosphoglycerat entsteht fast keine Kohlensäure. Falls man Fraktion I zuerst eine Stunde auf das Phosphoglycerat, dann nach Erhitzung weiter Fraktion II einwirken lässt, ist fast keine CO_2 -Entwicklung zu beobachten (Versuch 5 A).

Phosphoglycerinsäure ist andererseits imstande, die Angärung der Fruktose beträchtlich abzukürzen (Versuch 3 E). Falls nun Fraktion I auf das Gemisch von Fruktose und Phosphoglycerinsäure eine Stunde einwirkt und darauf nach Erhitzung die Wirkung der Fraktion II folgt, entwickelt sich CO_2 ziemlich schnell (Versuch 5 B). Berücksichtigt man den oben erwähnten Versuch, dass nämlich Fruktose allein durch stufenweise Wirkung der beiden Fraktionen keine CO_2 -Entwicklung zeigt, so kann man sagen, dass Fraktion I aus dem Gemisch von Fruktose und Phosphoglycerat entweder Brenztraubensäure oder eine in die Brenztraubensäure leicht überführbare Phosphobrenztraubensäure bildet. Anwesenheit von Phosphoglycerat ist unentbehrlich. Bei diesem Prozess kann man statt der Fraktion I die dialysierte Fraktion I + erhitzte Lösung der Fraktion II gebrauchen, wie der folgende Versuch ergab.

Ich habe das klare Zentrifugat der Fraktion I bzw. II-Lösung dialysiert. Falls das Dialysat der Fraktion I auf das Gemisch von Fruktose und Phosphoglycerat eine Stunde einwirkt und darauf nach einer Stunde die Wirkung des Dialysats der Fraktion II folgt, wird keine Gärung beobachtet (Versuch 8 A). Falls aber andererseits bei der erststufigen Wirkung der Fraktion I gleichzeitig die erhitzte Lösung der Fraktion II vorhanden ist,

entwickelt sich CO_2 bei der zweitstufigen Wirkung des Fraktion II-Dialysats (Versuch 8 B).

Zur Überführung des Gemisches von Fruktose+Phosphoglycerat in Brenztraubensäure oder eventuell in Phosphobrenztraubensäure ist also das nicht dialysierbare Apoferment der Fraktion I und das dialysierbare Co-Ferment in derselben Fraktion erforderlich, das letztere aber kann durch erhitzte Lösung der Fraktion II ersetzt werden.

Phosphoglycerinsäurebildung aus Hexosediphosphat erfolgt andererseits bekanntlich unter Mitwirkung der Co-zymase und des Adenylsäuresystems bei Anwesenheit von Hexose und Acetaldehyd. Diese Reaktion kann man auch statt durch Holozymase durch das Apoferment der Fraktion I+erhitzte Lösung der Fraktion II bekommen.

Das Gemisch Fraktion I-Dialysat+Fraktion II bewirkte lebhaftes CO_2 -Entwicklung aus Fruktose+Hexosediphosphat+Acetaldehyd+ MgCl_2 (Versuch 7 A). Ich habe auch eine schnelle Angärung von Fruktose+Hexosediphosphat+Acetaldehyd+ MgCl_2 durch dialysierte Fraktion I+dialysierte Fraktion II+erhitzte Lösung der Fraktion II beobachtet (Versuch 7 B). Ohne Hexosediphosphat erfolgt aber keine CO_2 -Bildung (Versuch 7 A). Wenn man die Fruktosegärung durch Fraktion I+II und ihre Beschleunigung bei Hexosediphosphatzusatz in Betracht zieht, so ist also das dialysierbare Co-Ferment der Fraktion I zur Phosphorierung der Hexose nötig. Wird das Hexosediphosphat einmal gebildet, ist zu seinem weiteren Umsatz das Co-Ferment der Fraktion II erforderlich, das der Fraktion I aber kann fehlen. Der Abbau des Hexosediphosphats soll über Phosphoglycerinsäure erfolgen. Das gebildete Phosphoglycerat kann dann, wie oben erwähnt, durch dialysierte Fraktion I+erhitzte Fraktion II-Lösung weiter in Brenztraubensäure oder in Phosphobrenztraubensäure überführt werden, welche beide durch Fraktion II vergärbar sind.

Der Umsatz von Hexosediphosphat in Phosphoglycerat erfolgt, soweit untersucht, möglicherweise durch dialysierte Fraktion I+erhitzte Fraktion II-Lösung. Denn nach einstündiger Einwirkung von dialysierter Fraktion I+erhitzter Fraktion II-Lösung auf

Fruktose und Hexosediphosphat, darauf folgender Erhitzung und erneuter Einwirkung von Fraktion II, konnte eine schwache, doch deutliche Gärung beobachtet werden (Versuch 9 A). Wenn bei diesem Versuch das Hexosediphosphat noch eine Stunde mit der dialysierten Fraktion I vorbehandelt wurde, war nämlich die Gärung in der letzten Stufe durch die Fraktion II allein ziemlich lebhaft (Versuch 9 B).

Ferner habe ich einen Versuch über die Phosphorsäureveresterung der Fruktose durch Fraktion I und II durchgeführt (Versuch 10). Ohne Acetaldehyd ist die Induktionsdauer der Angärung lang und während dieser Zeit bleibt der Veresterungsgrad gering. Falls aber Acetaldehyd zugesetzt wird, ist eine beträchtliche Phosphorierung schon von Anfang an zu beobachten.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Zymase wurde in zwei Fraktionen geteilt. Jede Fraktion besteht wieder aus dem nicht-dialysierbaren und dialysierbaren Teil: ApoF. I und CoF. I bzw. ApoF. II und CoF. II.

2. Überführung des Hexosediphosphats in Phosphoglycerat erfolgt bei Anwesenheit von Glukose durch die Wirkung von ApoF. I und CoF. II statt.

3. Phosphoglycerinsäure wird bei Anwesenheit von Glukose durch ApoF. I und CoF. II in Brenztraubensäure oder in Phosphobrenztraubensäure umgesetzt.

4. ApoF. II + CoF. II sind als Carboxylase wirksam.

5. Zur Phosphorylierung der Hexose ist CoF. I unentbehrlich.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. Herstellung der Fermente:

2 g Ebios, Trockenhefepräparat der Dainippon-Bier-Gesellschaft, Tokyo, wird mit 10 ccm Wasser 10 Minuten umgerührt und dann 10 Minuten (3000 Umdrehung pro. Min.) zentrifugiert. Ungefähr 6 ccm etwas getrübbter Lösung werden gewonnen. 6 ccm so hergestellten Extrakts werden dann unter Eiskühlung mit 3 ccm Azeton versetzt und zentrifugiert. Der dabei entstehende Boden-

satz ist Fraktion I. Die überstehende klare, gelbliche Lösung wird wieder in der Kälte mit 30 ccm Azeton versetzt. Der abgeschleuderte Niederschlag ist dann Fraktion II. Jede Fraktion wird durch Azeton-Äther-Behandlung in Trockenpulver überführt und im Exsikkator aufbewahrt.

Fraktion II ist carboxylasehaltig und in jeder Jahreszeit herzustellen, die wirksame Fraktion I ist aber nach meiner Erfahrung nur zu bekommen, wenn die Zimmertemperatur unter 18°C bleibt. Das Gärvermögen von Ebios ist stark, doch es schwankt naturgemäss etwas. Aus demselben "Stockpräparat" kann man aber nach dem oben erwähnten Verfahren jedesmal fast gleichwirksame Fraktionen I und II herstellen, solange die Zimmertemperatur nicht über 18°C steigt. Bei dieser Gelegenheit möchte ich der oben genannten Firma, die mir Ebios reichlich zur Verfügung gestellt hat, meinen herzlichen Dank sagen.

Bei den Versuchen wurde, wenn nicht besonders angegeben, Fraktion I in 3 ccm Wasser, Fraktion II in 5 ccm Wasser gelöst. Fraktion I wiegt durchschnittlich 0,15 g, enthält 0,018 g Kjeldahl-N und 0,14 mg anorganisches P. In dieser Fraktion ist eine wasserunlösliche Masse reichlich vorhanden. Die von dieser abgeschleuderte Lösung der Fraktion I ist nur gering getrübt.

Fraktion II wiegt durchschnittlich 0,2 g, enthält 0,019 g Kjeldahl-N und 8,5 mg anorganisches P. Sie ist fast ganz wasserlöslich. Durch Zentrifugieren wird eine ganz klare, schwach gelbliche Lösung erhalten.

Bei der Dialyse der Fraktion I oder II wurde die klar zentrifugierte Lösung jeder Fraktion in einen kleinen Kollodiumsack gefüllt, in 500 ccm destilliertem Wasser suspendiert und 18 Stunden in den Eisschrank gestellt. Die Lösung trübte sich in geringen Grade, sie wurde aber ohne Zentrifugieren für den Versuch verwandt.

Erhitzte Lösung der Fraktion II wurde auf folgende Weise hergestellt. Fraktion II wurde in 3 ccm Wasser gelöst, im Wasserbad von 80°C oder 100°C 3 Minuten erhitzte und von koaguliertem Eiweiss durch Zentrifugieren befreit. Eine klare, strohgelbe Lösung wurde erhalten.

2. *Substrate:*

1) Fruktose (Kahlbaum).

2) Hexosediphosphat. Candiolin (Bayer) wurde nach Neuberg und Sabetay (1925) gereinigt.

Analyse: $C_6H_{10}O_4(PO_4Ca)_2 \dots 416,3$

Gesamt-P ber. 14,9%, gef. 14,8%.

3) Neubergester wurde nach Neuberg (1918) aus gereinigtem Candiolin durch partielle Hydrolyse mittels Oxalsäure bereitet.

Analyse: $C_6H_{11}O_5(PO_4Ca) \cdot H_2O \dots 316,244$

Gesamt-P ber. 9,81%, gef. 9,77%.

4) Embdenester, Barium-Hexose-6-Phosphat, wurde nach Ostern, Guthke und Umschweif (1937) hergestellt. Das über Phosphorpentoxyd bei 60° getrocknete Präparat ergab bei der

Analyse: $C_6H_{11}O_5(PO_4Ba) \dots 397,54$

Gesamt-P ber. 7,88%, gef. 7,2%.

Ostern und seine Mitarbeiter haben auch 7,3% gebundenen P gefunden.

5) Coriester, Glukose-1-phosphorsaures Barium, wurde nach Cori, Clowick und Cori (1937) aus Acetobromglukose und Silberphosphat bereitet. Nach Angabe dieser Autoren sind 3 Molekül Krystallwasser schwer zu entfernen, daher habe ich das Bariumsalz einfach bei 100° zur Gewichtskonstante getrocknet und analysiert.

Analyse: $C_6H_{11}O_5(PO_4Ba) \cdot 3H_2O \dots 449,58$

Gesamt-P ber. 6,9%, gef. 6,87%.

6) Phosphoglycerinsäure wurde als Bariumsalz nach Neuberg und Vercellone (1935) hergestellt; Glukose wurde bei Anwesenheit von Hexosediphosphat und Acetaldehyd unter Zusatz von Flourid 3 Stunden vergoren und aus dem klaren Zentrifugat nach Entfernung des anorganischen Phosphat die Phosphoglycerinsäure als Bariumsalz niedergeschlagen und mittels Alkohols umgefällt.

Analyse: $C_3H_5O_7(PO_4Ba) \cdot 3H_2O \dots 375,44$

Gesamt-P ber. 12,10%, gef. 12,31%.

Sowohl Phosphorsäureester der Hexose als Phosphoglycerat

wurden durch Doppelumsetzung mit Kaliumsulfat oder Kaliumoxalat in Kaliumsalz überführt und ihre 1 M Lösung für die Versuche gebraucht. Nur der Coriester wurde in $M/4$ Lösung überführt. 1 M Lösung des Acetaldehyds wurde jedes Mal frisch bereitet.

3. Pufferlösung:

$M/10$ Phosphat und $M/2$ Acetatgemisch. pH 6.

4. Bestimmungsmethode:

Zur Messung des entwickelten CO_2 -Gasvolumens wurde der Apparat von Kobayashi (1936) benutzt. Der Versuch wurde bei 37° im elektrisch regulierten Wasserbad ausgeführt.

Fruktose, Hexosephosphat oder Phosphoglyceratlösung wurden jedes Mal in den Seitenast des Troges einpipettiert. Im Hauptraum des Troges waren Puffer und Fermentlösung, ausserdem je nach der Vorschrift Acetaldehyd und $MgCl_2$ vorhanden. Vorherige CO_2 -Sättigung wurde nicht ausgeführt. Temperatenausgleich und Volumenveränderung waren in 20–25 Minuten beendet, dann wurde der Inhalt des Seitenastes durch starkes Schütteln in den Hauptraum eingegossen und die Volumenzunahme zeitlich gemessen. Über das Verfahren der Volummessung siehe die Beschreibung von Kobayashi (1936).

ERGEBNISSE.

1. Prüfung der Gärfähigkeit der Fraktion I und II.

Zum Vergleich wurde die Fruktosegärung mit 6 ccm wässrigen Ebiosextraktes ausgeführt. Wie oben erwähnt, wurden Fraktion I und II aus diesem Volumen Extrakt hergestellt.

- a) Wässriger Ebiosextrakt 6 ccm + $M/10$ Phosphatpuffer 2,0 ccm + Wasser 3 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.
- b) Fraktion I in 3 ccm Wasser + Fraktion II in 5 ccm Wasser + $M/10$ Phosphat 2,0 ccm + Wasser 1 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.
- c) Fraktion I in 3 ccm Wasser + $M/10$ Phosphat 2,0 ccm + Wasser 6 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.
- d) Fraktion II in 5 ccm Wasser + $M/10$ Phosphat 2,0 ccm + 4 ccm Wasser + 1 M Fruktose 1,0 ccm.

	a	b	c	d
5'	2,25 ccm	0,70 ccm	0,60 ccm	0,25 ccm
10'	5,35 "	1,20 "	0,70 "	0,30 "
20'	7,55 "	3,80 "	1,10 "	0,40 "
30'	11,10 "	8,00 "	1,50 "	0,50 "
40'	12,50 "	8,75 "	1,65 "	0,55 "
50'	13,70 "	9,30 "	1,90 "	0,55 "
60'	14,30 "	9,90 "	2,10 "	0,55 "

2. Einfluss des Acetaldehyds auf die Induktionsdauer der Fruktosegärung.

- Wässriger Ebioseextrakt 6 ccm + M/10 Phosphat 2,0 ccm + Wasser 3 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.
- Wässriger Ebioseextrakt 6 ccm + M/10 Phosphat 2,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + Wasser 2 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.
- Fraktion I in 3 ccm Wasser + Fraktion II in 5 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + Wasser 1 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.
- Fraktion I in 3 ccm Wasser + Fraktion II in 5 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.

	Ebioseextrakt		Fraktion I u. II	
	ohne Acetaldehyd	mit Acetaldehyd	ohne Acetaldehyd	mit Acetaldehyd
5'	2,25 ccm	3,25 ccm	0,75 ccm	2,10 ccm
10'	5,35 "	5,15 "	1,20 "	3,75 "
20'	7,55 "	6,85 "	5,00 "	7,00 "
30'	11,10 "	10,80 "	9,20 "	9,20 "
40'	12,20 "	12,20 "	10,40 "	10,30 "
50'	12,80 "	12,75 "	11,10 "	11,60 "
60'	13,30 "	13,05 "	11,70 "	12,70 "

3. Gärung der verschiedenen Hexosephosphate oder des Phosphoglycerats und ihr Einfluss auf die Fruktosegärung.

Vorliegende Versuche hindurch wurden als Fermentlösung Fraktion I in 3 ccm Wasser und Fraktion II in 5 ccm Wasser und als Puffer 2 ccm Phosphat verwandt. Im Hauptraum des Troges

befand sich ausserdem unter Umständen 1,0 ccm Acetaldehyd und 0-1,5 ccm Wasser, um bei Beginn der Gärungsversuche, d. h. nach dem Eingiessen der im Seitenast vorhandenen Substratlösung (Phosphorsäureester- oder ausserdem Fruktoselösung) das gesamte Volumen auf 12 ccm zu halten.

A. Hexosediphosphat.

- 1) M/2 Hexosediphosphat 1,0 ccm.
- 2) M/2 Hexosediphosphat 1,0 ccm + M Acetaldehyd 1,0 ccm.
- 3) M Fruktose 0,5 ccm + M/2 Hexosediphosphat 1,0 ccm.
- 4) M Fruktose 0,5 ccm + M/2 Hexosediphosphat 1,0 ccm + M Acetaldehyd 1,0 ccm.

	1	2	3	4
5'	0,20 ccm	0,20 ccm	1,20 ccm	1,70 ccm
10'	0,25 "	0,25 "	2,75 "	3,50 "
20'	0,30 "	0,30 "	6,75 "	6,75 "
30'	0,30 "	0,30 "	9,25 "	8,75 "
40'	0,30 "	0,30 "	9,75 "	9,70 "
50'	0,30 "	0,30 "	10,25 "	10,80 "
60'	0,30 "	0,30 "	10,75 "	11,30 "

B. Embdenester.

- 1) M Hexose-mono-phosphat 0,5 ccm.
- 2) M Hexose-mono-phosphat 0,5 ccm + M Acetaldehyd 1,0 ccm.
- 3) M Fruktose 0,5 ccm + M Hexose-mono-phosphat 0,5 ccm.
- 4) M Fruktose 0,5 ccm + M Hexose-mono-phosphat 0,5 ccm + M Acetaldehyd 1,0 ccm.

	1	2	3	4
5'	1,75 ccm	2,00 ccm	1,70 ccm	2,25 ccm
10'	2,75 "	2,75 "	2,80 "	3,60 "
20'	3,50 "	3,50 "	5,70 "	6,75 "
30'	3,75 "	3,75 "	8,40 "	8,70 "
40'	4,00 "	3,90 "	9,80 "	9,90 "
50'	4,10 "	4,10 "	11,25 "	11,20 "
60'	4,20 "	4,20 "	11,85 "	11,80 "

C. Neubergester.

- 1) M Hexose-mono-phosphat 0,5 ccm.
- 2) M Hexose-mono-phosphat 0,5 ccm + M Acetaldehyd 1,0 ccm.
- 3) M Fruktose 0,5 ccm + M Hexose-monophosphat 0,5 ccm.
- 4) M Fruktose 0,5 ccm + M Hexose-mono-phosphat 0,5 ccm + M Acetaldehyd 0,5 ccm.

	1	2	3	4
5'	2,00 ccm	2,10 ccm	2,50 ccm	3,25 ccm
10'	3,25 "	3,20 "	6,25 "	6,30 "
20'	4,20 "	4,10 "	8,75 "	8,75 "
30'	4,75 "	4,75 "	10,10 "	10,10 "
40'	5,30 "	5,30 "	11,65 "	11,50 "
50'	5,75 "	5,75 "	12,60 "	12,20 "
60'	6,00 "	6,00 "	13,40 "	13,20 "

D. Coriester.

- 1) M/4 Glukose-1-phosphat 2,0 ccm.
- 2) M/4 Glukose-1-phosphat 2,0 ccm + M Acetaldehyd 1,0 ccm.
- 3) M Fruktose 0,5 ccm + M/4 Glukose-1-phosphat 2,0 ccm.

	1	2	3
5'	0,60 ccm	1,00 ccm	0,75 ccm
10'	1,10 "	1,75 "	1,50 "
20'	2,65 "	3,25 "	6,50 "
30'	3,25 "	3,75 "	10,50 "
40'	3,50 "	4,00 "	12,60 "
50'	3,75 "	4,25 "	13,50 "
60'	4,00 "	4,50 "	14,00 "

E. Phosphoglycerat.

- 1) M Phosphoglycerinsäure 0,5 ccm.
- 2) M Phosphoglycerinsäure 0,5 ccm + M Acetaldehyd 1,0 ccm.
- 3) M Phosphoglycerinsäure 0,5 ccm + M/2 Candioliu 1,0 ccm.
- 4) M Fruktose 0,5 ccm + M Phosphoglycerinsäure 0,5 ccm.

	1	2	3	4
5'	0,60 ccm	0,80 ccm	0,60 ccm	2,20 ccm
10'	1,20 "	1,60 "	1,00 "	6,00 "
20'	2,10 "	2,25 "	2,20 "	11,00 "
30'	2,50 "	3,00 "	2,70 "	12,00 "
40'	3,10 "	3,25 "	3,00 "	12,65 "
50'	3,50 "	3,50 "	3,25 "	13,20 "
60'	3,75 "	3,75 "	3,50 "	13,60 "

4. *Stufenweise Einwirkung der Fraktion I und II auf Fruktose.*

Die Zusammensetzung der Versuchslösung der ersten Stufe wird in den nachstehenden Protokollen jedesmal angegeben. Die Dauer des erststufigen Versuchs betrug überall 1 Stunde. Dann wurde die Lösung in kleinem Erlenmeyerkolben auf 80° 5 Minuten erhitzt und für den Versuch der zweiten Stufe in einen neuen Trog eingegossen; diesmal wurde Fraktion II-Lösung in den Seitenast gefüllt. Erhitzte Lösung der Fraktion II wurde auf folgende Weise hergestellt. Fraktion II wurde in 3 ccm Wasser gelöst, in siedendem Wasserbad 20 Minuten erhitzt und dann klar zentrifugiert.

A. 1. Stufe: Fraktion I in 3 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.

2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

B. 1. Stufe: Fraktion I in 3 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + erhitzte Lösung der Fraktion II in 3 ccm Wasser + 1 M Fruktose 1,0 ccm.

2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

C. 1. Stufe: Fraktion I in 3 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + M/4 Hexosediphosphat 1,0 ccm + M/20 MgCl₂ 1,0 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm + erhitzte Lösung der Fraktion II.

2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

		A	B	C
1. Stufe	5'	0,60 ccm	0,60 ccm	0,60 ccm
	10'	0,75 "	0,75 "	0,75 "
	20'	1,10 "	1,10 "	1,00 "
	30'	1,50 "	1,15 "	1,50 "
	40'	1,65 "	1,80 "	1,80 "
	50'	1,90 "	2,20 "	2,30 "
	60'	2,10 "	2,25 "	2,60 "
2. Stufe	5'	0,25 "	1,60 "	0,70 ccm
	10'	0,30 "	2,20 "	1,25 "
	20'	0,40 "	2,75 "	2,25 "
	30'	0,50 "	3,00 "	3,00 "
	40'	0,55 "	3,25 "	3,20 "
	50'	0,60 "	3,50 "	3,25 "
	60'	0,60 "	3,55 "	3,30 "

5. Stufenweise Einwirkung der Fraktion I und II auf Phosphoglycerat oder Phosphoglycerat + Fruktose.

- A. 1. Stufe: Fraktion I in 3 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + M/2 Phosphoglycerat 1,0 ccm.
 2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.
 B. 1. Stufe: Fraktion I in 3 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + M/2 Phosphoglycerat 1,0 ccm + 1 M Fruktose 0,5 ccm.
 2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

		A	B
1. Stufe	5'	0,25 ccm	0,20 ccm
	10'	0,35 "	0,40 "
	20'	0,40 "	1,00 "
	30'	0,45 "	1,85 "
	40'	0,70 "	2,60 "
	50'	0,80 "	3,20 "
	60'	1,10 "	3,75 "
2. Stufe	5'	0,25 "	2,50 "
	10'	0,65 "	5,75 "
	20'	0,85 "	8,00 "
	30'	1,00 "	8,50 "
	40'	1,10 "	8,55 "
	50'	1,20 "	8,65 "
	60'	1,25 "	8,75 "

6. Wirkung der zentrifugierten Lösung der Fraktion I.

- A. Zentrifugat aus Fraktion I in 3 ccm Wasser + Fraktion II in 5 ccm Wasser + Acetatpuffer 1 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm.
 B. Do., aber statt Acetaldehyd 1 ccm Wasser.
 C. Fraktion I in 3 ccm Wasser + Fraktion II in 5 ccm Wasser + Acetatpuffer 1 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm.
 D. Do., aber statt Acetaldehyd 1,0 ccm Wasser.

	A	B	C	D
5'	1,50 ccm	0,70 ccm	1,70 ccm	0,60 ccm
10'	2,75 "	1,50 "	3,20 "	1,40 "
20'	5,20 "	4,20 "	6,50 "	4,75 "
30'	7,30 "	7,10 "	8,50 "	7,60 "
40'	8,25 "	8,10 "	9,20 "	8,60 "
50'	8,40 "	8,50 "	9,30 "	9,00 "
60'	8,70 "	9,00 "	9,75 "	9,50 "

7. Über die dialysierte Fraktion I bzw. II.

Fraktion I wurde in 3 ccm Wasser gelöst und zentrifugiert und die klare überstehende Lösung gegen 500 ccm Wasser im Eisschrank 20 Stunden dialysiert. Fraktion II wurde in 5 ccm Wasser gelöst und ihr Zentrifugat in gleicher Weise dialysiert.

A. Wirkung des Fraktion I-Dialysats + Fraktion II.

- 1) Dialysierte Fraktion I 3 ccm + Fraktion II in 5 ccm Wasser + Acetatpuffer 2 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.
- 2) Dialysierte Fraktion I 3 ccm + Fraktion II in 5 ccm Wasser + Acetatpuffer 2 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + $M/20$ $MgCl_2$ 1 ccm.
- 3) Dialysierte Fraktion I 3 ccm + Fraktion II in 5 ccm Wasser + 1 M Fruktose 1,0 ccm + $M/20$ $MgCl_2$ 1 ccm + $M/2$ Candiolin 0,5 ccm.
- 4) Dialysierte Fraktion I 3 ccm + Fraktion II in 5 ccm Wasser + 1 M Fruktose 1,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + $M/2$ Candiolin 0,5 ccm + $M/20$ $MgCl_2$ 1,0 ccm.

	1	2	3	4
5'	0,20 ccm	0,30 ccm	0,50 ccm	2,00 ccm
10'	0,25 "	0,60 "	1,25 "	4,20 "
20'	0,50 "	0,80 "	4,00 "	6,30 "
30'	0,55 "	1,00 "	4,50 "	7,00 "
40'	0,65 "	1,30 "	5,25 "	8,20 "
50'	0,70 "	1,50 "	5,80 "	9,20 "
60'	0,75 "	1,75 "	6,25 "	10,70 "

B. Wirkung der dialysierten Fraktion I + II.

- 1) Dialysierte Fraktion I + dialysierte Fraktion II + Acetatpuffer 2,0 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + $M/2$ Candiolin 1,0 ccm + $M/20$ $MgCl_2$ 1,0 ccm.
- 2) Do., aber ausserdem unter Zusatz von 3 ccm erhitzter Fraktion II-Lösung.

	1	2
5'	0,25 ccm	0,80 ccm
10'	0,30 "	1,70 "
20'	0,35 "	3,25 "
30'	0,50 "	5,00 "
40'	0,60 "	6,10 "
50'	0,70 "	7,10 "
60'	0,80 "	8,00 "
120'	1,00 "	11,00 "

8. *Stufenweise Wirkung der dialysierten I und II-Fractionen.*

A. 1. Stufe: dialysierte Fraktion I 3 ccm + Acetatpuffer 2,0 ccm + 1 M Fruktose 0,5 ccm + M/2 Phosphoglycerinsäure 1,0 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.

2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

B. 1. Stufe: dialysierte Fraktion I 3 ccm + Acetatpuffer 2,0 ccm + 1 M Fruktose 0,5 ccm + M/2 Phosphoglycerinsäure 1,0 ccm + 3 ccm erhitzte Fraktion II-Lösung.

2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

		A	B
1. Stufe	5'	0,10 ccm	0,10 ccm
	10'	0,20 "	0,20 "
	20'	0,20 "	0,25 "
	30'	0,20 "	0,25 "
	40'	0,20 "	0,25 "
	50'	0,20 "	0,25 "
	60'	0,20 "	0,25 "
2. Stufe	5'	0,20 "	0,75 "
	10'	0,30 "	1,60 "
	20'	0,35 "	3,00 "
	30'	0,45 "	4,15 "
	40'	0,55 "	5,00 "
	50'	0,65 "	6,20 "
	60'	0,70 "	7,60 "

9. *Wirkung der dialysierten Fraktion I + der erhitzten Fraktion II-Lösung.*

A. 1. Stufe: dialysierte Fraktion I 3 ccm + 3 ccm erhitzte Fraktion II-Lösung + Acetatpuffer 2,0 ccm + 1 M Fruktose 0,5 ccm + M/20 MgCl₂ + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + M/2 Candiolum 1,0 ccm.

2. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

B. 1. Stufe: dialysierte Fraktion I 3 ccm + 3 ccm erhitzte Fraktion II-Lösung + M/20 MgCl₂ + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + M/2 Candiolum 1,0 ccm.

2. Stufe: dialysierte Fraktion I 3,0 ccm + 3 ccm erhitzte Fraktion II-Lösung + 1 M Fruktose 1,0 ccm.

3. Stufe: Fraktion II in 5 ccm Wasser.

		A	B
1. Stufe	5'	0 ccm	0 ccm
	10'	0 "	0 "
	20'	0 "	0 "
	30'	0 "	0 "
	40'	0 "	0 "
	50'	0 "	0 "
	60'	0 "	0 "
2. Stufe	5'	0,30 "	0 "
	10'	0,50 "	0 "
	20'	1,00 "	0 "
	30'	1,75 "	0 "
	40'	2,20 "	0 "
	50'	2,65 "	0 "
	60'	3,25 "	0 "
	120'	5,70 "	0 "
3. Stufe	5'		0,55 "
	10'		1,50 "
	20'		2,80 "
	30'		4,00 "
	40'		5,25 "
	50'		6,20 "
	60'		7,25 "

10. Phosphorylierung bei der Fruktosegärung durch Fraktion I+II.

A. Fraktion I+II in 6,0 ccm Wasser + M/10 Phosphat 2,0 ccm + 1 M Acetaldehyd 1,0 ccm + 1 M Fruktose 1,0 ccm.

B. Do., aber statt Acetaldehyd 1,0 ccm Wasser.

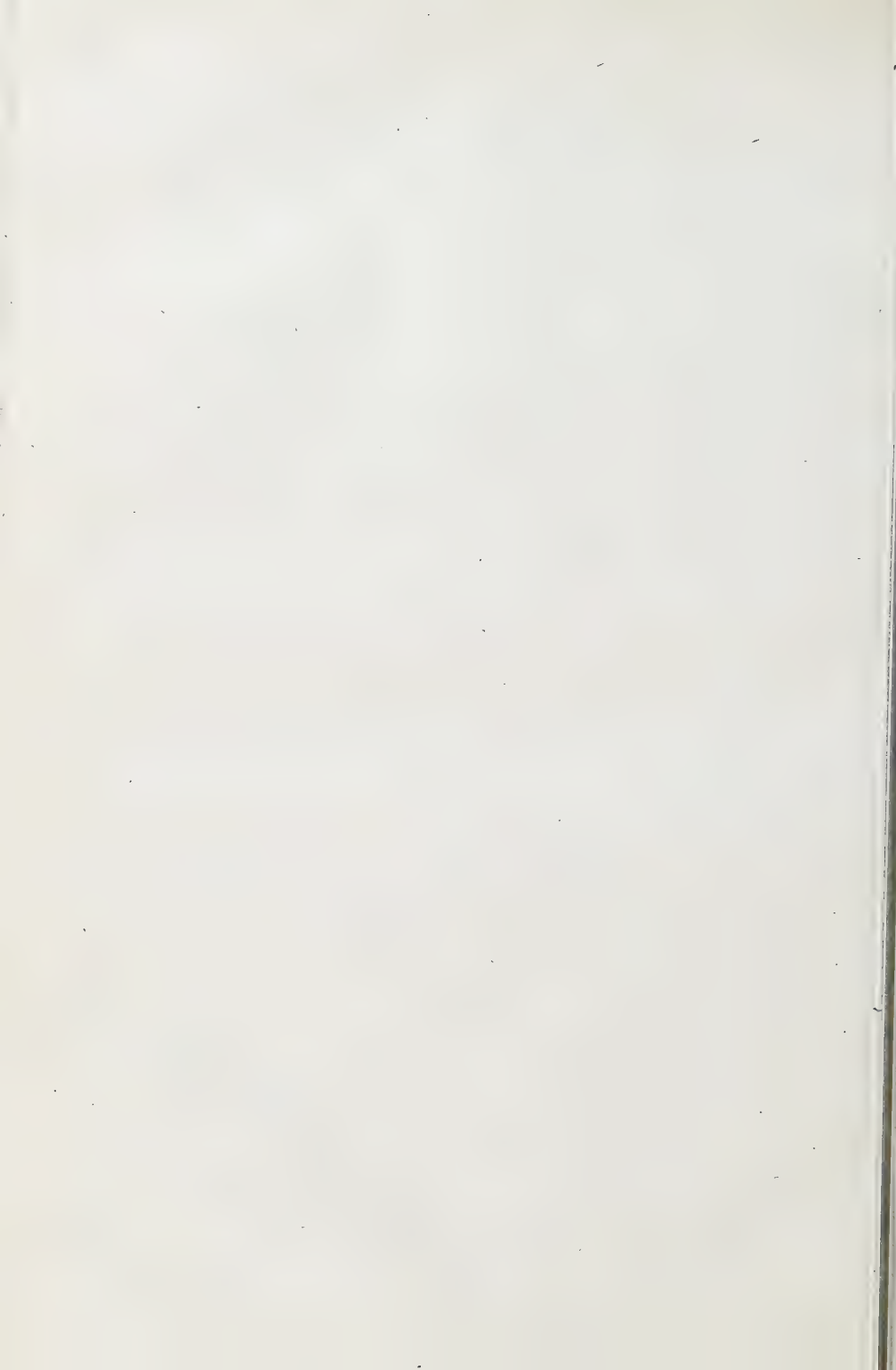
Bei jedem Versuch wurden 2 Ansätze bereitet, der erste zur CO₂-Messung und der zweite zur Bestimmung des anorganischen P. Für die Messung des P-Gehalts wurde 1 ccm Versuchslösung in ein Gemisch von 10 ccm 16% Trichloressigsäure + 9 ccm Wasser eingeblasen, wodurch die Versuchslösung 20fach verdünnt wurde. An 1 ccm Filtrat wurde dann die P-Bestimmung nach Fiske-

Subbarow ausgeführt. In nachstehender Tabelle ist der in 1 ccm verdünntem Filtrat gefundene P-Wert angegeben. Da Fraktion I und II schon a priori phosphathaltig waren, war der sofort nach der Versuchsanstellung bemessene P-Wert höher als der des extra zugesetzten Phosphat-P. Aus diesem sofortigen P-Wert wurde aber der Veresterungsgrad errechnet.

	mit Acetaldehyd			ohne Acetaldehyd		
	CO ₂	P in mg	%	CO ₂	P in mg	%
sofort		0,0830			0,0830	
10'	3,30 ccm	0,0660	20,7	0,25 ccm	0,0782	5,8
20'	7,00 "	0,0273	67,2	0,80 "	0,0763	8,3
30'	9,50 "	0,0184	78,9	1,90 "	0,0724	13,2
60'	13,90 "	0,0086	89,4	10,75 "	0,0416	49,8

LITERATUR.

- Cori, C. F., Clowick, S. P. u. Cori, G. T. (1937): J. biol. Chem., 121, 465.
- Kobayashi, C. (1936): J. of Biochem., 24, 369.
- Neuberg, C. (1918): Biochem. Zeitschr., 88, 432.
- Neuberg, C. u. Sabetay, S. (1925): Biochem. Zeitschr., 161, 240.
- Ostern, P., Guthke, J. A. u. Umschweif, B. (1937): Enzymologia, 3, 5.
- Vercellone, A. u. Neuberg, C. (1935): Biochem. Zeitschr., 280, 161.



ÜBER DIE REINIGUNG DER CARBOXYLASE.

VON

KICHINOSUKE SUGAYA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 20. Dezember 1939)

In der vorangehenden Mitteilung habe ich über Fruktosegärung durch Fermentpräparate, die aus Ebiosextrakt fraktionierend hergestellt wurden, berichtet. Die zweite Fraktion ist ein zellfreies, schwach gelbliches Pulver und enthält eine stark wirksame Carboxylase. Wie von Kobayashi (1936) angegeben, ist dieses Carboxylasepulver lange haltbar. Ich habe mit diesem Präparat Reinigungsversuche der Carboxylase durchgeführt.

Wird das Carboxylasepulver mit Wasser versetzt und von einer sehr geringen unlöslichen, flockigen Masse abzentrifugiert, bekommt man eine ganz klare, schwach gelbliche Lösung, die auf Brenztraubensäure stark decarboxylierend wirkt. Diese Carboxylaselösung ist aber nicht genügend haltbar. Schon am nächsten Tag sinkt ihre Aktivität zur Hälfte herab und nach 3 Tagen ist sie fast nicht mehr wirksam. Bez. dieser Carboxylaselösung ist noch folgender Befund zu erwähnen. Falls die klare Fermentlösung im Gärungstrog mit Acetatpuffer von $\text{pH } 5.2$ gemischt und bis zum Temperatúrausgleich 20 Minuten in ein Wasserbad von 37° gestellt wird, fällt schon hierbei eine deutliche Trübung des Gemisches auf, die nach Zusatz von gepufferter Brenztraubensäurelösung schnell zunimmt und in einen flockigen Niederschlag übergeht, was die Anwesenheit von unbeständigem Eiweiss anzeigt.

Schoenebeck und Neuberg (1935) haben eine äusserst grosse Beständigkeit der Carboxylase in 50% Glycerinlösung angegeben, wogegen das Ferment in wässriger Lösung sehr unbeständig ist. Kobayashi (1936) konnte dies bestätigen. Der gute Erfolg des Glycerinzusatzes soll darin begründet sein, dass

eine spontane oder vielleicht fermentative Zerstörung des Co-Ferments oder Apoferments der Carboxylase verhindert wird. Unter dieser Annahme habe ich versucht, den eiweissartigen Begleitstoff adsorptiv zu entfernen, da nach meiner bisherigen Erfahrung die einmal adsorbierte Carboxylase aus dem Adsorbens schwer zu eluieren war. Zwecks Schätzung des Reinigungsgrades habe ich zuerst untersucht, ob die Haltbarkeit der Carboxylaselösung nach dem Adsorptionsverfahren vergrößert wird und ob sich die Versuchslösung während der Brenztraubensäurespaltung trübt oder klar bleibt, da die Herstellung eines Fermentpräparats, das in der Versuchslösung während der Versuchsdauer nicht ausfällt, immer wünschenswert ist. Bei der Reinigung muss Aktivitätsverminderung möglichst vermieden werden.

Zur Messung der CO_2 -Entwicklung wurde der Apparat von Kobayashi (1936) benutzt.

Zuerst wurde das Carboxylasepräparat d. h. die Fraktion II des Ebiosextrakts in Wasser gelöst, mit Tonerde C γ versetzt, mit Kohlensäure gesättigt und nach 30 minutigem Schütteln zentrifugiert. Eine farblose, klare Lösung wurde so gewonnen. Sie war carboxylatisch etwas schwächer als die unbehandelte Lösung. Wurde sie jedoch im Eisschrank aufbewahrt, blieb die Carboxylasewirkung wenigstens 4 Tage unverändert und verminderte sich erst nach einer Woche zur Hälfte. Die Stabilität nahm also beträchtlich zu. Diese Lösung blieb ausserdem bei 37° im Azetapuffer von pH 5,2 wenigstens während 20 Minuten, d. h. bis zum Erreichen der Volumenkonstanz des Gasraums, klar. Nach Pyruvinatzusatz trübte sich die Lösung aber allmählich in geringem, doch deutlich merkbarem Grad. Über die schwere Adsorbierbarkeit der Carboxylase an Tonerde hat schon Schoenebeck (1934) berichtet. Wurde für obiges Adsorptionsverfahren statt Tonerde gefälltes Eisenhydroxydgel gebraucht, war das Zentrifugat klar und nur schwach gelblich gefärbt. Diese Lösung blieb fermentativ fast ebenso stark wirksam wie die Ausgangslösung und behielt, falls im Eisschrank aufbewahrt, ihre Aktivität wenigstens eine Woche. Man kann also annehmen, dass jener, die Labilität der Carboxylaselösung verursachende Faktor durch Eisenhydroxydbehandlung

zum grössten Teil entfernt wird. Dieses Verfahren hat aber den Nachteil, dass die so gewonnene Lösung während des Carboxylaseversuchs eine fast gleichgradige Trübung, wie die Ausgangslösung zeigt. Die Anwesenheit dieses Eiweissanteils, der während des Carboxylaseversuchs zur Ausfällung neigt, steht daher nicht ohne weiteres zur Haltbarkeit der Carboxylaselösung in Beziehung.

Ich habe dann die Eisenhydroxyd- und Tonerdebehandlung kombiniert. Die so gewonnene Lösung war farblos und bleib auch während des Carboxylaseversuchs wasserklar. Ihre Wirksamkeit war wenigstens 8 Tage unverändert.

Die Trennung der Co-Carboxylase und des Apoferments aus der Carboxylaselösung habe ich noch nicht ausgeführt. Ich kann aber bereits sagen, dass die durch Dialyse abgeschwächte Fermentlösung durch Zusatz einer erhitzten Carboxylasepulverlösung wieder verstärkt wird und ausserdem, dass jene Inaktivierung der Carboxylase während des Aufbewahrens von dem Zerfall sowohl der Co-Carboxylase als auch der Apocarboxylase abhängt, denn so lange die Abschwächung nicht hochgradig ist, kann die Reaktivierung durch einfach erhitzte Lösung von Carboxylasepulver verwirklicht werden, aber später ist dies nicht mehr möglich.

Durch die oben erwähnten Verfahren konnte die Haltbarkeit der Carboxylaselösung beträchtlich verbessert werden. Bezweckt man ein langes Aufbewahren der Fermentlösung, ist der Glycerinzusatz schon hinreichend, wobei ein Adsorptionsverfahren nicht unbedingt nötig wird. Zur Reinigung der Carboxylase für die Zymaseanalyse und den Wiederaufbau des Zymasesystems ist aber meines Erachtens der Zusatz eines fremden Stoffes möglichst zu vermeiden.

Gehalt der Trockensubstanz und Kjeldahl-N der Fermentlösungen nach den einzelnen Adsorptionsverfahren ist in folgender Tabelle angegeben.

	Trockenstoff	Kjeldahl-N
1. rohes Carboxylasepulver	0,197 g	0,0182 g
2. nach Tonerdeadsorption	0,136 g	0,0135 g
3. nach Eisenhydroxydadsorption	0,123 g	0,0127 g
4. nach Tonerde-Eisenhydroxyd-Adsorption	0,097 g	0,0097 g

Es war auffallend, dass der Kjeldahl-N Gehalt der Trockensubstanz bei jeder Lösung ungefähr 10% betrug und ausserdem, dass nach Entfernung einer beträchtlichen Menge des labilen Eiweisses durch Tonerde-Eisenhydroxydbehandlung das Gewicht der Trockensubstanz nur zur Hälfte des Ausgangspulvers herunterging. Dies bedeutet, dass im rohen Carboxylasepulver eine niedermolekulare N-Substanz in reichlicher Menge vorhanden ist, was bei der Herstellungsweise jenes Pulvers nicht verwunderlich ist. Ich habe eine Fermentlösung, die nach Tonerde-Eisenhydroxydbehandlung gewonnen wurde, gegen destilliertes Wasser 20 Stunden dialysiert und festgestellt, dass der Kjeldahl-N auf 0,00105 g herunterging, während das einfache Dialysat der Lösung rohen Carboxylasepulvers noch 0,00340 g Kjeldahl-N zeigte.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Rohes Carboxylasepulver ist die in voriger Mitteilung beschriebene Fraktion II, die nach Kobayashi (1936) aus Ebiosextrakt durch Azetonfällung hergestellt wurde. Fraktion II wurde jedesmal aus 2 g Ebios bereitet. Die Carboxylasewirkung der einzelnen Fraktionen II war, sofern sie aus demselben Ebiosstock bereitet wurde, fast gleich.

Als Substratlösung wurde ein Gemisch von 1,0 ccm M Brenztraubensäure (Präparat von Merck) + 2,0 ccm M Pyridin verwandt.

Zur Messung der Carboxylasewirkung wurde der Apparat von Kobayashi (1936) benutzt. Über diesen siehe dessen Mitteilung. Versuchstemperatur 37°.

1. Rohe Carboxylaselösung.

Das rohe Pulver, d.h. Fraktion II aus wässrigem Extrakt von Ebios (2 g), wurde in 6,0 ccm Wasser gelöst und von einer geringen flockigen Masse klar abzentrifugiert.

A. Ihre Wirkung war folgende.

nach Minuten	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
CO ₂ ccm	6,10	9,30	14,20	15,50	15,70	15,75	15,80

B. Haltbarkeit der rohen Carboxylaselösung.

Aufbewahrung im Eisschrank	CO ₂ nach Minuten						
	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
Sofort	6,10 ccm	9,10 "	14,00 "	15,50 "	15,70 "	15,75 "	15,80 "
nach 24 Stdn.	3,10 ccm	4,30 "	7,40 "	9,00 "	10,10 "	11,20 "	12,30 "
nach 72 "	0,40 ccm	0,95 "	1,30 "	1,50 "	1,70 "	1,75 "	1,80 "

2. Tonerdebehandelte Carboxylaselösung.

Rohes Carboxylasepulver wurde in 6 ccm Wasser im Zentrifugenglas gelöst, mit 1,0 ccm Tonerde C₇ (29 mg Al₂O₃) gemischt, darin CO₂ 3 Minuten eingeleitet, um die Lösung damit zu sättigen, das Zentrifugenglas mit Kork fest zugestöpselt, 30 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Die Wirkung dieser Carboxylaselösung war folgende:

Aufbewahrung im Eisschrank	CO ₂ nach Minuten						
	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
Sofort	4,25 ccm	6,65 "	9,50 "	12,20 "	13,50 "	14,70 "	16,05 "
nach 48 Stdn.	4,25 ccm	6,50 "	9,50 "	12,25 "	13,40 "	14,50 "	16,10 "
nach 72 "	4,00 ccm	6,15 "	9,00 "	11,30 "	12,75 "	13,85 "	15,30 "
nach 168 "	2,30 ccm	3,75 "	4,90 "	5,75 "	6,50 "	6,80 "	7,00 "

3. Eisenhydroxydbehandelte Lösung.

Rohes Carboxylasepulver wurde in gleicher Weise in 6 ccm Wasser gelöst. Als Adsorbens diente 5 ccm Eisenhydroxydgel (70 mg Fe(OH)₃). Dieses Gel wurde durch alkalische Fällung des Eisenchlorids und nachherige wiederholte Auswaschung des Niederschlages hergestellt. Um Volumzunahme der Carboxylaselösung zu vermeiden, wurden diese 5 ccm Suspension zentrifugiert und der Bodensatz dann mit der Carboxylaselösung umgerührt. Weitere CO₂-Durchleitung, Schüttelung usw. wie oben.

Aufbewahrung im Eisschrank	CO ₂ nach Minuten						
	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
Sofort	5,25 ccm	8,85 "	12,75 "	14,85 "	16,10 "	17,50 "	18,50 "
72 Stdn.	4,25 ccm	6,75 "	9,25 "	11,75 "	12,75 "	13,35 "	14,00 "
168 "	4,25 ccm	6,60 "	9,20 "	11,40 "	12,70 "	13,25 "	13,90 "

4. Tonerde-Eisenhydroxydbehandelte Carboxylaselösung.

Die eisenhydroxydbehandelte Carboxylaselösung wurde zuerst, wie oben. hergestellt, die zentrifugierte Lösung dann mit 1 ccm Tonerde gemischt und weiter wie früher mit CO₂ gesättigt, schliesslich 30 Minuten geschüttelt und zentrifugiert.

Aufbewahrung im Eisschrank	CO ₂ nach Minuten						
	5'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
Sofort	3,75 ccm	6,00 "	9,00 "	11,00 "	11,75 "	12,10 "	12,50 "
72 Stdn.	3,75 ccm	6,00 "	8,50 "	10,50 "	11,25 "	11,60 "	12,00 "
168 "	3,65 ccm	5,65 "	7,25 "	8,00 "	8,50 "	8,80 "	9,10 "

LITERATUR.

- Kobayashi, C. (1936): J. of Biochem., **24**, 367.
 Schoenebeck, O. (1934): Biochem. Z., **272**, 42.
 Schoenebeck, O. u. Neuberg, C. (1935): Biochem. Z., **275**, 330.
 Sugaya, K. (1940): J. of Biochem., **31**, 119.

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE UNVERSEIFBAREN SUBSTANZEN.

II. Mitteilung.

Über die Schwankung der Lipoidmenge in den Muskeln nach der Gefässunterbindung.

VON

SHIMEO SAITO.

(Aus dem Mediz.-Chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.

Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1939)

I. EINLEITUNG.

Die Untersuchungen Sugiyamas (1937) unseres Institutes haben gezeigt, dass nach dem Durchschneiden des N. ischiadicus beim Hund das Phosphatid und Cholesterin in seinem peripheren Nervengewebe mit der Zeit abnehmen, und dass diese Substanzen in engem Zusammenhang zur Nervenfunktion stehen dürften. In meiner Untersuchung habe ich die Blutgefässe von Tieren unterbunden, um bei Entstehung der Nekrose des Muskels zu entscheiden, welcher Schwankung die Lipoidmenge in den Muskeln unterliegt, und dadurch den Zusammenhang zwischen der Nekroseentstehung und dem Lipoid zu erfahren.

II. UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND UNTERSUCHUNGSMETHODE.

1. Versuchstiere.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen, die mit Okara, Gemüse und Gerste aufgefüttert wurden.

2. Operationstechnik.

Für die Versuche wurden die unteren Extremitäten benutzt, an denen nach der Gefässunterbindung mit nächst dargelegter

Methode in ihren peripheren Muskeln die Nekrose erzeugt wurde.

Im Vorversuch konnte ich bei der blossen Unterbindung der A. femoralis in den peripheren Muskeln die Veränderung kaum beobachten. Erst nachdem die A. femoralis und V. femoralis gleichzeitig unterbunden worden waren, gelang es die Nekrose in den peripheren Muskeln hervorzurufen; aber es fanden sich noch viele Fälle, bei denen sie nicht zutage trat. Bei folgender Methode konnte ich schliesslich den Zweck erreichen.

Es wurden beim Kaninchen die A. femoralis und V. femoralis, Vasa ischiadicae, A. circumflexa femoris lateralis und Vasa saphenae magnae unterbunden und durchgeschnitten und zugleich auch der N. femoralis und N. ischiadicus durchtrennt. Bei solcher Operation kommt ich die Nekrose in den peripheren Muskeln hervorbringen, in dem Verhältnis wie es Tabelle I zeigt.

TABELLE I.

n. d. Operation	Experim. Tierzahl	nekrot. Veränderung.		
		Grad	Anfallszahl	%
3 Tage	19	—	5	73,7
		+	10	
		++	2	
		+++	2	
6 Tage	20	—	3	85,0
		+	2	
		++	7	
		+++	8	
9 Tage	23	—	3	86,9
		+	8	
		++	6	
		+++	6	
15 Tage	15	—	8	46,6
		+	3	
		++	3	
		+++	1	
20 Tage	15	—	11	26,6
		+	2	
		++	2	
		+++	0	
gesamt.	92		62	67,3

Entsprechend dem Grade der Nekroseentstehung wurde die Markierung mit $(-)$, $(+)$, $(++)$, $(+++)$ vorgenommen. So gibt $(-)$ die makroskopisch beinahe unveränderten Fälle an, bei denen man aber histologisch leichtgradige Trübung und Anschwellung der Muskelfasern beobachten konnte. Die Fälle $(-)$ wurden ebenfalls für die Versuche benutzt. Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, wurde in 62 von 92 Fällen die Nekroseentstehung nachgewiesen. Bei näherer Betrachtung ergibt sich ein Entstehungswert am 3. Tage nach der Operation von 73,7%, am 6. Tage danach 85,0%, am 9. Tage 86,9%, am 15. Tage 46,6% und am 20. Tage 26,6%. Es folgt hieraus, dass der Wert vom 6. bis 9. Tage nach der Operation am höchsten ist und danach sich allmählich der Rückkehr zur Norm zuwendet. Bei der Rückkehr beobachtet man die Entwicklung und Neubildung der Kollateralbahn. Es gibt auch Fälle, bei denen die Rückkehr verzögert ist, und auch solche, bei denen die der Nekrose anheimgefallenen Muskeln eingetrocknet sind und mumienhaft aussehen.

Hinsichtlich des Verlaufes der Nekroseentstehung zeigen die Beobachtungen, dass in den meisten Fällen zuerst wegen der Kreislaufstörung die Muskeln anschwellen, dunkelrote bis graue Färbung annehmen, mit dem zeitlichen Verlauf degenerieren und meistens von Muskelatrophie begleitet sind. Die Nekrose solcher peripheren Muskeln bietet histologisch Trübung und Anschwellung der Muskelfasern und die stellenweise Degeneration.

3. *Quantitative Methode.*

Nach der Durchführung der Operation auf der einen Seite der unteren Extremität wurden über ihre peripheren Muskeln die quantitative Bestimmung von Wasser, Fettsäure, Cholesterin und Phosphatid vorgenommen. Die Muskeln der anderen Seite dienten zur Kontrolle. Für die Versuche wurden alle Muskeln der unteren Extremitäten—*M. tibialis anterior*, *M. extensor digitorum pedis longus*, *M. peroneus tertius*, *M. peroneus quartus*, *M. triceps surae*—beigemennt benutzt. Die Menge der Fettsäure wurde nach der Kumagawa-Sutoschen (1908), die des Cholesterins wurde an den nach der Kumagawa-Sutoschen Methode isolierten un-

verseifbaren Substanzen nach der Reaktion von Liebermann-Burchard, das Phosphatid nach der von Sueyoshi (1937) und das Phosphor nach der von Naito (1928) bestimmt.

III. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

a. Normale Kaninchen. Versuche über die beiderseitigen Muskeln.

Es wurden zunächst an den Muskeln der einen Seite der unteren Extremität das Wasser, die Fettsäure, das Cholesterin und Phosphatid quantitative bestimmt; darauf wurde untersucht, bis zu welchem Grade die Ergebnisse mit denen der anderen Seite übereinstimmen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt.

TABELLE II.

Tier-Nr.	Wasser (%)		Fettsäure (%)		Cholesterin (mg%)		Phosphatid-P. (mg%)	
	rech. Seit.	link. Seit.	rech. Seit.	link. Seit.	rech. Seit.	link. Seit.	rech. Seit.	link. Seit.
1	75,07	75,53	0,85	0,81	52,6	53,1	36,0	35,7
2	75,86	75,47	0,70	0,79	38,9	42,1	32,1	36,4
3	75,52	75,52	0,86	0,85	51,4	52,1	33,0	38,2
mitt.	75,55	75,50	0,80	0,82	47,6	49,1	34,0	36,7

Nach den Ergebnissen der Tabelle II sind Wasser-, Fettsäure-Cholesterin- und Phosphatidgehalt der beiderseitigen Muskeln an Menge beinahe übereinstimmend.

b. Versuche nach der Operation.

An Kaninchen wurde nun nach der Operation mit oben erwähnter Methode am 3. 6. 9. und 20. Tage auf der betreffenden Seite der unteren Extremität Versuche angestellt, und die Ergebnisse wurden mit denen der Versuche auf der anderen Seite verglichen.

1) Wassergehalt.

Die Veränderungen des Wassergehaltes sind in Tabelle III angegeben.

TABELLE III.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Wasser (%)			nekrot. Veränder.
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.	
3 Tage	8	74,52	82,05	+ 7,53	+
	9	73,63	77,52	+ 3,89	—
	10	76,48	85,17	+ 8,69	++
	11	76,27	81,84	+ 5,57	+
	12	74,61	74,77	+ 0,16	+
	mittel	75,10	80,27	+ 5,17	
6 Tage	13	74,72	85,12	+ 10,40	—
	14	75,61	82,27	+ 6,66	++
	15	75,80	76,52	+ 0,72	+
	17	74,82	81,14	+ 6,32	++
	18	76,68	83,17	+ 6,49	+++
	mittel	75,52	81,64	+ 6,12	
9 Tage	19	75,20	83,80	+ 8,60	++
	21	77,26	80,05	+ 2,79	+
	22	76,46	76,83	+ 0,37	+
	23	75,10	75,38	+ 0,28	+
	mittel	76,00	78,27	+ 2,27	
15 Tage	173	76,86	76,19	— 0,67	—
	174	75,31	76,69	+ 1,38	—
	175	76,00	78,63	+ 2,63	++
	mittel	76,05	77,17	+ 1,12	
20 Tage	179	76,11	77,41	+ 1,30	++
	180	75,22	75,15	— 0,07	+
	181	76,00	76,36	+ 0,36	—
	mittel	75,71	76,30	+ 0,59	

Am 3. Tage nach der Operation hat der Wassergehalt, bei den Operationsseiten im Vergleich zu den Kontrollseiten zugenommen,

indem er bei den Kontrollseiten 75,1% und bei den Operationsseiten 80,2% im Durchschnitt beträgt. Am 6. Tage hat der Wassergehalt bei allen Fällen zugenommen, mit 81,6% im Durchschnitt. Am 9. Tage ist er bei einigen Fällen beinahe zur Norm zurückgekehrt, mit einem Durchschnitt von 78,2%, aber etwas höher als bei der Kontrolle. Am 15. Tage liegt er nahezu bei der Norm, mit einem Durchschnitt von 77,1%. Am 20. Tage ist er auch normal, mit einem Durchschnitt von 76,3%. Somit geht aus den obigen Ergebnissen hervor, dass der zugenommene Wassergehalt am 6. Tage am höchsten ist und danach allmählich zur Norm zurückkehrt. Besonders bei den Fällen Nr. 10, 14, 17, 18 und 19 mit auffallender nekrotischer Muskelveränderung zeigte sich eine starke Zunahme des Wassergehaltes.

2) *Fettsäuremenge.*

Es wurden über die Fettsäuremenge die folgenden Ergebnisse erhalten.

Nach den Ergebnissen in Tabelle IV ist bei den Fällen Nr. 9 und Nr. 10 am 3. Tage nach der Operation die Neigung zur geringen Zunahme zu bemerken; im Vergleich zu den Kontrollseiten zeigt sich bei den Operationsseiten eine Zunahme von 0,75% im Durchschnitt. Am 6. Tage nach der Operation ist, mit Ausnahme von Fall Nr. 15, an den Operationsseiten aller sonstigen Fälle eine Zunahme von 1,76% im Durchschnitt zu bemerken. Am 9. Tage ist die Zunahme geringer, mit 0,68% im Durchschnitt. Am 15. und 20. Tage kann man keine Zunahme mehr bemerken. Nach den obigen Ergebnissen nimmt nach der Unterbindung der Blutgefäße die Fettsäuremenge in den peripheren Muskeln zu, die Zunahme ist am 6. Tage deutlich zu bemerken.

3) *Cholesterinmenge.*

Die gewonnenen Ergebnisse sind in Tabelle V wiedergegeben.

Aus Tabelle V geht hervor, dass am 3. Tage nach der Operation bei allen Fällen an den Operationsseiten die Neigung zur Zunahme der Cholesterinmenge zu beobachten war, deren Zunahme am 6. Tage deutlich war, mit 269,4 mg% im Durchschnitt. Besonders bei den Fällen Nr. 10, 17 und 18 mit deutlicher Muskel-

TABELLE IV.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Fettsäure (%)		
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.
3 Tage	8	2,11	2,78	+0,67
	9	2,15	3,52	+1,37
	10	2,87	3,67	+0,80
	11	2,07	2,76	+0,69
	12	3,12	3,28	+0,16
	mittel	2,46	3,21	+0,75
6 Tage	13	2,75	4,66	+1,91
	14	2,00	3,36	+1,36
	15	2,23	2,31	+0,08
	17	2,77	6,56	+3,79
	18	2,61	4,26	+1,65
	mittel	2,47	4,23	+1,76
9 Tage	19	2,48	3,88	+1,40
	20	—	3,24	—
	21	2,64	3,41	+0,77
	22	2,34	2,46	+0,12
	23	2,90	3,36	+0,46
	mittel	2,59	3,27	+0,68
15 Tage	173	3,44	2,84	-0,60
	174	2,83	3,46	+0,63
	175	3,58	4,29	+0,71
	mittel	3,28	3,53	+0,25
20 Tage	179	3,01	3,67	+0,66
	180	3,86	3,33	-0,53
	181	3,50	3,92	+0,42
	mittel	3,45	3,64	+0,19

veränderung zeigte sich eine starke Zunahme. Eine Zunahme konnte man am 9. Tage noch bei allen Fällen beobachten, die zugenommene Menge war hoch beim Fall Nr. 19 mit deutlicher Muskelveränderung, mit 129,7mg% im Durchschnitt. Am 15. Tage nach der Operation war ebenfalls noch eine Zunahme zu kon-

TABELLE V.

n. d. Operat.	Tier-Nr.	Cholesterin (mg%)		
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.
3 Tage	8	232,8	311,1	+ 78,3
	9	222,8	272,6	+ 49,8
	10	266,3	421,8	+155,5
	11	224,2	301,7	+ 77,5
	12	256,4	273,8	+ 17,4
	mittel	240,5	316,2	+ 75,7
6 Tage	13	256,5	363,3	+106,8
	14	276,5	395,6	+119,1
	15	247,8	282,8	+ 35,0
	17	234,6	902,2	+667,6
	18	178,5	597,2	+418,7
	mittel	228,8	508,2	+269,4
9 Tage	19	233,0	544,3	+311,3
	20	—	279,2	—
	21	225,8	322,7	+ 96,9
	22	186,8	266,4	+ 79,6
	23	210,8	306,7	+ 95,9
	mittel	214,1	343,8	+129,7
15 Tage	173	250,9	404,6	+153,7
	174	322,7	454,3	+131,6
	175	179,6	404,2	+224,6
	mittel	251,0	421,0	+170,0
20 Tage	179	216,7	352,6	+135,9
	180	220,9	375,8	+150,9
	181	255,8	439,0	+183,8
	mittel	231,1	389,3	+158,2

statieren, die sich jedoch am 20. Tage verringerte. Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass nach der Gefäßunterbindung die Cholesterinmenge in den peripheren Muskeln zunimmt; die Zunahme ist am 6. Tage am höchsten, sie setzt sich bis zum 9. und 15. Tage fort und wird erst am 20. Tage geringer.

4) *Phosphatidmenge.*

Nach der Gefäßunterbindung konnte man die Schwankung der Phosphatidmenge in den Muskeln beobachten, wie es Tabelle VI zeigt.

TABELLE VI.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Phosphatid-P. (mg%)		
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.
3 Tage	8	117,2	100,2	-17,0
	9	148,9	108,7	-40,9
	10	152,3	89,2	-63,1
	11	148,0	136,9	-11,1
	12	130,2	125,3	- 4,9
	mittel	139,3	112,0	-27,3
6 Tage	13	123,7	138,0	+14,3
	14	141,7	114,0	-27,7
	15	173,8	141,2	-32,6
	17	123,8	100,7	-23,1
	18	129,0	98,1	-30,9
	mittel	138,4	118,4	-20,0
9 Tage	19	142,8	158,6	+16,2
	20	—	92,4	—
	21	123,5	149,4	+25,9
	22	143,3	138,5	- 4,8
	23	162,7	147,4	-15,3
	mittel	143,1	137,2	- 5,9
15 Tage	173	141,3	158,1	+16,8
	174	132,8	120,5	-12,3
	175	137,1	142,1	+ 5,0
	mittel	137,0	140,2	+ 3,2
20 Tage	179	138,9	134,0	- 4,9
	180	132,6	123,8	- 8,8
	181	128,0	128,6	+ 0,6
	mittel	133,1	128,8	- 4,3

Nach den Ergebnissen der Tabelle VI zeigt die Phosphatidmenge in den Muskeln am 3. und 6. Tage nach der Gefäßunterbindung die Neigung zu geringer Abnahme, unterliegt aber nach dem 9. Tage keiner Schwankung.

ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

Die obigen Ergebnisse lassen sich folgendermassen zusammenfassen.

1. Auf beiden Seiten der unteren Extremitäten des Kaninchens ergaben sich bei der Bestimmung des Wasser-, Fettsäure-, Cholesterin- und Phosphatidgehaltes in den Muskeln nahezu gleiche Mengen.

2. Bei der Unterbindung der Gefässe der unteren Extremität konnte man bei 62 unter 92 Fällen, d. h. in 67,3% der Fälle die Nekroseentstehung makroskopisch beobachten. Die Entstehungswerte nach der Operation waren folgende: am 3. Tage 73,7%, 6. Tage 85,0%, 9. Tage 86,9%, 15. Tage 46,6% und 20. Tage 26,6%; also war die Nekroseentstehung vom 6.-9. Tage am höchsten und wendete sich dann allmählich der Heilung zu.

3. Der Wassergehalt in den Muskeln der unteren Extremitäten hatte schon am 3. Tage nach der Gefäßunterbindung zugenommen, am 6. Tage war er noch höher, nahm jedoch vom 9. Tage ab und kehrte am 20. Tage zur Norm zurück.

4. Die Fettsäuremenge zeigte am 3. Tage nach der Operation die Neigung einwenig zuzunehmen, am 6. Tage hatte sie im Vergleich zur Kontrolle deutlich zugenommen, mit 1,76% im Durchschnitt, am 9. Tage war die Zunahme gering, und nach dem 15. Tage zeigte sie den normalen Wert.

5. Die Cholesterinmenge zeigte am 3 Tage nach der Operation eine Neigung zur Zunahme, die am 6. Tage im Vergleich zur Kontrolle deutlich war, mit 269,4 mg% im Durchschnitt. Besonders bei den Fällen mit auffallender Nekrose der Muskeln zeigt sich eine starke Zunahme. Sogar am 9. Tage setzte sich die Zunahme noch fort, mit 129,7 mg% im Vergleich zur Kontrolle. Vom 15. Tage an wurde der Grad der Zunahme allmählich geringer.

6. Die Phosphatidmenge zeigte am 3. und 6. Tage nach der Operation die Neigung zu geringer Abnahme, und vom 9. Tage an war im Vergleich mit der Kontrolle kein Unterschied zu konstatieren.

Aus obigen Ergebnissen lässt sich die folgende Schlussfolgerung ziehen.

1. Nach der Gefässunterbindung der unteren Extremitäten des Kaninchens fallen die Muskeln der unteren Extremitäten der Nekrose anheim, dabei nehmen Fettsäure und Cholesterin in den Muskeln an Menge zu, die Phosphatidmenge nimmt etwas ab.

2. Die Cholesterinmenge erfährt eine sehr deutliche Zunahme, die bei den Fällen mit auffallender Nekrose besonders stark ist. Aus dieser Tatsache kann man schliessen, dass die Zunahme von Cholesterin zur Nekroseentstehung in dem Muskel innige Beziehung hat.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

Kumagawa u. Suto (1908): *Bioch. Z.*, 8, 212.

Naito (1928): *J. Biochem.*, 15, 45.

Sueyoshi (1937): *J. Biochem.*, 25, 151.

Sugiyama (1937): Gedächtnisabhandlung zum 15 jährigen Jubiläum des psychiatrischen Instit. der Keio-Universit., 430.

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE UNVERSEIFBAREN SUBSTANZEN.

III. Mitteilung.

Über die Auswirkung der Lipidnahrung in dem Muskel des
mit Cholesterin gefütterten Kaninchens nach
der Gefäßunterbindung.

Von

KHIMIO SAITO.

(Aus dem Med.-Chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.

Vorstand: Prof. T. Sugiyama.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1939.)

I. EINLEITUNG.

Beim Kaninchen mit normaler Kost, bei welchem durch die Gefäßunterbindung der unteren Extremität die Nekrose in ihrem peripheren Muskel hervorgerufen wurde, konnte ich (1935), bei der Bestimmung des Wassergehaltes, der Fettsäure-, Cholesterin- und Phosphatidmenge in den nekrotisierten Muskeln, eine beträchtliche Zunahme der Cholesterinmenge feststellen, und schloss daraus, dass das Cholesterin eine innige Beziehung zum nekrotischen Verfall des Muskelgewebes hat. Da Kimizuka (1935), schon früher gezeigt hat, dass durch die längere Darreichung von Cholesterin seine Menge in dem Muskelgewebe zunimmt, habe ich bei den Kaninchen mit zugenommener Cholesterinmenge in dem Gewebe, wie in vorher beschriebenen Versuchen, die Gefäße der unteren Extremität unterbunden, um nun zu erfahren, welcher Prozentsatz der Nekroseentstehung in dem Muskel sich zeigt und welcher Schwankung sein Wassergehalt, seine Fettsäure-, seine Cholesterin- und Phosphatidmengen unterliegen.

II. VERSUCHSTIERE UND UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Der für die Versuche benutzte Versuchstier wurde schon früher

Gemüse und Gerste täglich je 0,5 g Cholesterin 40 Tage lang dargereicht. Die Untersuchungsmethode war die gleiche wie die der vorigen Mitteilung.

III. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

Mit obiger Methode wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

a) Prozentwert der Nekroscntstehung.

In Tabelle I A, ist der Prozentwert der Kaninchen mit Cholesterinkost angeführt, und zum Vergleich ist auch der des Kaninchens mit normaler Kost in der Tabelle I B wiedergegeben.

TABELLE I A.

n. d. Operat.	experim. Tierzahl	nekrotische Veränder.		
		Grad	Anfallszahl	%
3 Tage	12	—	2	83,3
		+	6	
		++	4	
		+++	0	
6 Tage	26	—	13	50,0
		+	3	
		++	3	
		+++	7	
9 Tage	26	—	14	46,1
		+	3	
		++	4	
		+++	5	
15 Tage	21	—	17	19,0
		+	0	
		++	3	
		+++	1	
20 Tage	12	—	11	8,3
		+	1	
		++	0	
		+++	0	
gesamt.	91		34	36,9

TABELLE I B.

n. d. operat.	nekrotische Veränderung.		
	norm. Kaninch. (%)	Cholest.-Kaninch. (%)	Differ.
3 Tage	73,7	83,3	+ 9,6
6 Tage	85,0	50,0	- 35,0
9 Tage	86,9	46,1	- 40,8
15 Tage	46,6	19,0	- 27,6
20 Tage	26,6	8,3	- 18,3
mittel	67,3	36,9	- 30,4

Nach den Ergebnissen der Tabelle I erreicht der Prozentwert der Nekroseentstehung am 3. Tage nach der Operation 83,3%, er zeigt im Vergleich zu 73,7% der Kaninchen mit normaler Kost die Neigung zu geringer Zunahme. Obgleich bei den normalen Kaninchen der Entstehungswert am 9. Tage 85%, am 9. Tage 86,9% ergab, war er bei den Cholesterin-Kaninchen nur 50% am 6. Tage und 46,1% am 9. Tage, zeigte also eine Abnahme von 35% bei ersteren und 40,8% bei letzteren. Auch am 15. Tage betrug er nur 27,6% und am 20. Tage 18,3%. Unter 91 Versuchsfällen trat die Nekrose in 34 Fällen auf, der Prozentwert von 36,9% ist im Vergleich zu den normalen Kaninchen um 30,4% niedriger.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Prozentwert der Nekroseentstehung am 6. Tage nach der Operation bei der Cholesterinkost beträchtlich geringer ist als bei normaler Kost. Wenn man die geringe Verschiedenheit im Entstehungswerte am 3. Tage zwischen den Cholesterin-Kaninchen und Kaninchen mit normaler Kost erwägt, so kann man annehmen, dass die Cholesterinkost die Heilung der Nekrose stark begünstigt.

b) Wassergehalt.

Die Veränderung des Wassergehaltes ist aus Tabelle II ersichtlich.

Nach den Ergebnissen der Tabelle II zeigt bei den Fällen Nr. 36 und 38, bei denen die Nekrose je am 6. und 9. Tage nach

TABELLE II.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Wasser (%)			nekrot. Veränder.
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.	
6 Tage	34	76,12	77,20	+1,08	—
	35	76,27	74,94	+8,67	—
	36	75,91	83,55	+7,64	+
	Mittel	76,10	78,58	+2,48	
9 Tage	37	75,24	76,57	+1,33	—
	38	76,56	84,56	+8,00	##
	39	75,80	76,09	+0,29	—
	Mittel	75,86	79,07	+3,21	
15 Tage	176	76,49	76,73	+0,24	—
	177	76,00	75,01	—0,99	+
	178	76,75	76,39	—0,36	—
	Mittel	76,41	76,14	—0,27	
20 Tage	182	76,48	76,25	—0,23	—
	183	75,31	75,27	—0,04	—
	184	75,80	76,88	+1,08	—
	Mittel	75,86	76,13	+0,27	

der Operation entsteht, der Wassergehalt eine beträchtliche Zunahme, während bei den anderen Fällen eine Zunahme beinahe nicht zu bemerken ist. Dies mit den Ergebnissen bei normaler Kost verglichen, sind die zunehmenden Fälle gering.

c) Fettsäuremenge.

Die Schwankung der Fettsäuremenge veranschaulicht Tabelle III.

Aus Tabelle III erhellt, dass am 9. Tage nach der Operation die Fettsäuremenge zugenommen hat. Der Grad der Zunahme verhält sich gleich dem bei normaler Kost.

d) Cholesterinmenge.

Die Schwankung der Cholesterinmenge ist aus Tabelle IV ersichtlich.

TABELLE III.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Fettsäure (%)		
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.
6 Tage	34	2,49	2,62	+ 0,13
	35	2,88	3,16	+ 0,28
	36	2,25	3,67	+ 1,42
	Mittel	2,54	3,14	+ 0,60
9 Tage	37	3,50	4,13	+ 0,63
	38	3,21	6,30	+ 3,09
	39	2,33	2,55	+ 0,22
	Mittel	3,01	4,32	+ 1,31
15 Tage	176	4,14	3,30	− 0,84
	177	3,48	3,43	− 0,05
	178	3,06	3,86	+ 0,80
	Mittel	3,56	3,53	− 0,03
20 Tage	182	2,45	3,52	+ 1,07
	183	3,96	3,75	− 0,21
	184	4,17	3,01	− 1,16
	Mittel	3,52	3,42	− 0,10

TABELLE IV.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Cholesterin (%)		
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.
6 Tage	34	285,7	415,0	+ 129,3
	35	317,8	282,7	− 35,1
	36	308,9	750,0	+ 441,1
	Mittel	304,1	482,5	+ 178,4
9 Tage	37	268,7	462,5	+ 193,8
	38	311,5	3169,5	+ 2758,0
	39	373,1	479,6	+ 106,5
	Mittel	317,5	1370,5	+ 1053,0
15 Tage	176	331,8	861,4	+ 529,6
	177	302,1	1012,4	+ 710,3
	178	305,2	435,4	+ 130,2
	Mittel	313,1	769,7	+ 456,6
20 Tage	182	454,7	947,5	+ 492,8
	183	349,8	508,4	+ 158,6
	184	255,3	1142,2	+ 886,9
	Mittel	353,2	866,0	+ 512,8

Aus Tabelle IV geht hervor, dass die Cholesterinmenge am 6. Tage nach der Operation gegenüber der Kontrolle eine Zunahme erfährt, mit 178,4 mg% im Durchschnitt. Am 9. Tage kommt es zu noch weiterer Zunahme, um 1053,0 mg% im Vergleich zur Kontrolle. Fall Nr. 38, bei dem wegen starker Nekroseentstehung auch das Ansteigen der Cholesterinmenge beträchtlich ist, zeigt in der Tat eine Zunahme von 2758,0 mg% gegenüber der Kontrolle. Auch am 15. und 20. Tage ist im Vergleich zur Kontrolle ein Ansteigen festzustellen, mit 456,6 mg% und 512,8 mg%. Dass bei normaler Kost nach der Gefäßunterbindung die Cholesterinmenge in den Muskeln eine Zunahme erfährt, ist schon in meinen Versuchen bewiesen worden, indem am 6. Tage sich eine höchste Zunahme im Vergleich zur Kontrolle zeigte, mit 269,4 mg% im Durchschnitt. Ein Vergleich dieser zugenommenen Menge zu dem höchsten Ansteigen (1053,0 mg%) bei dem Cholesterin-Kaninchen zeigt offensichtlich die merkwürdig reichliche Zunahme der Cholesterinmenge in den Muskeln des letzteren.

e) *Phosphatidmenge.*

Die Schwankung der Phosphatidmenge ist in Tabelle V angeführt.

TABELLE V.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Phosphatid-P. (mg%)		
		norm. Seit.	oper. Seit.	Differ.
6 Tage	34	142,8	137,5	- 5,3
	35	132,7	134,1	+ 1,4
	36	140,2	173,7	+33,5
	Mittel	138,6	148,4	+ 9,8
9 Tage	37	138,1	140,4	+ 2,3
	38	145,3	167,5	+22,2
	39	167,2	114,5	-52,7
	Mittel	150,2	140,8	- 9,4
15 Tage	176	134,7	138,2	+ 3,5
	177	143,3	122,0	-21,3
	178	144,6	124,8	-19,8
	Mittel	140,8	128,4	-12,4
20 Tage	182	165,3	151,2	-14,1
	183	126,3	137,5	+11,2
	184	150,0	158,1	+ 8,1
	Mittel	147,1	138,9	- 8,2

Wie Tabelle V zeigt, ist die Schwankung der Phosphatidmenge nach der Operation verhältnissmässig gering.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

Die obigen Ergebnisse können folgendermassen zusammengefasst werden.

1. Die Nekrose in den peripheren Muskeln, welche nach der Gefässunterbindung der unteren Extremitäten bei den Cholesterin-Kaninchen entstanden ist, kommt in 34 unter 91 Fällen vor, ihr Entstehungswert ist im Vergleich zu den Fällen mit normaler Kost gering, nur 36,9% gegenüber 67,3% bei normaler Kost.

2. Der Wassergehalt in den peripheren Muskeln nach der Gefässunterbindung der unteren Extremitäten nimmt bei dem Cholesterin-Kaninchen zu, jedoch schwach im Vergleich zu den Kaninchen mit normaler Kost.

3. Die Zunahme der Fettsäuremenge nach der Operation verhält sich gleich wie beim Kaninchen mit normaler Nahrung.

4. Die Cholesterinmenge erfährt nach der Operation eine Zunahme, sie nimmt am 9. Tage im Vergleich zur Kontrolle um 1053,0 mg% zu, die grösste Zunahme darstellend, und zeigt am 15. und 20. Tage noch eine beträchtliche Zunahme. Mit 269,4 mg% der am stärksten zunehmenden Fälle bei normaler Nahrung verglichen, wurde eine starke Zunahme von Cholesterin beobachtet.

5. Die Phosphatidmenge unterliegt geringer Schwankung nach der Operation.

Nach obigen Ergebnissen sind bei dem Cholesterin-Kaninchen die in den peripheren Muskeln nach der Gefässunterbindung der unteren Extremitäten entstandenen Veränderungen folgende:

1. Der Prozentwert der Nekroscntstehung in den peripheren Muskeln ist im Vergleich zu den Kaninchen mit normaler Kost viel kleiner.

2. Die Zunahme des Wassergehaltes ist schwächer als bei normaler Kost.

3. Die Cholesterinmenge zeigt eine merkwürdig starke Zunahme im Vergleich mit der bei normaler Nahrung.

4. Die Zunahme der Cholesterinmenge scheint die Heilung

der Nekrose zu fördern.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

Kimizuka (1938): J. Bioch., **27**, 469.

Saito (1939): J. Bioch., **31**, 143.

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE UNVERSEIFBAREN SUBSTANZEN.

IV. Mitteilung.

Über die Mengenschwankung der verschiedenen Substanzen
in den Muskeln des Kaninchens mit normaler sowie
Cholesterin-Kost nach der Gefässunterbindung.

VON

SHIMEO SAITO.

(Aus dem Mediz.-Chem. Institut der Keio-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 24. Dezember 1939)

I. EINLEITUNG.

In einer vorhergehenden Abhandlung habe ich (1939) schon berichtet, dass es nach der Gefässunterbindung der Unterextremität des Kaninchens zur Entstehung der Nekrose in den peripheren Muskeln kommt und zugleich mit der allmählichen Cholesterinzunahme auch die Nekrose die Wendung zum Bessern nimmt. Auch habe ich berichtet, dass, wenn man an den Kaninchen das Cholesterin länger fortgesetzt verabreicht und die gleichen Versuche ausführt, das in dem Muskel zunehmende Cholesterin beträchtlicher ist als bei normaler Kost, dazu noch der Prozentwert der Nekroseentstehung nach der Operation eine stärkere Abnahme erfährt als bei normaler Kost, und dass das Cholesterin eine fördernde Wirkung zum Bessern der Nekrose des Muskels zu haben scheint. Ich habe nun beim Kaninchen mit normaler sowie Cholesterinkost nach der Durchführung der Gefässunterbindung der Unterextremität die Bestimmung der Schwankung von verschiedenen Substanzen in dem peripheren Muskel vorgenommen, um zu entscheiden, ob die Schwankung der Substanzmenge sicher bei der Cholesteringabe früher als bei gewöhnlicher Ernährung wiederhergestellt wird oder nicht.

II. UNTERSUCHUNGSMETHODE.

Die Versuchstiere und die Untersuchungsmethode waren die gleichen wie in voriger Mitteilung.

Die Bestimmung der Substanzen in dem Muskel wurde wie folgt durchgeführt.

Das Glykogen wurde nach der Methode von Suto (1931), der Zucker nach der Methode von Fujita-Iwatake (1932), die anorganische Phosphorsäure und die säurelösliche Phosphorsäure nach der Methode von Fiske-Subbarow (1925) bestimmt. Das Phosphagen wurde nach der Methode von Lehnartz (1929) und Tomita (1936) gewogen. Das Kreatin wurde nach der Enteiweissung und der Veränderung in Kreatinin nach der Methode von Folin-Wu (1919), der gesamte lösliche Stickstoff, Reststickstoff und Eiweissstickstoff nach der Methode von Denticke (1930) bestimmt.

III. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

1. *Glykogen.*

A. *Bei Kaninchen mit normaler Kost.* Über die Ergebnisse unterrichtet Tabelle I A.

Nach den Ergebnissen der Tabelle I A kommt es am 3. Tage nach der Operation schon zur Abnahme der Glykogenmenge, etwa um die Hälfte der Kontrolle. Am 6. Tage ist der Mengenwert beträchtlich vermindert, um 83% unter dem der Kontrolle. Am 9. Tage zeigt sich noch eine Abnahme von etwa 70%, während nach dem 15. Tage der Grad der Abnahme kleiner wird.

B. *Beim Cholesterin-Kaninchen.* Die Ergebnisse veranschaulicht Tabelle I B.

Aus Tabelle I B ist zu ersehen, dass am 3. Tage nach der Operation sich kein Unterschied in der Abnahme des Mengenwertes mit dem bei gewöhnlicher Kost zeigt, indem die Glykogenmenge bei beiden Fällen um etwa die Hälfte abnimmt. Dagegen nimmt der Wert am 6. und 9. Tage um etwa 32% ab und die Abnahme ist bedeutend niedriger als bei gewöhnlicher Kost. Nach dem 15. Tage ist der Wert der Abnahme niedrig. Vergleicht man die obigen Ergebnisse mit denen bei gewöhnlicher Kost, so ist der

TABELLE I A.

norm. Kaninchen

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Glykogen (%)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
3 Tage	185	1,34	0,87	-0,47	35,0
	186	1,60	1,10	-0,50	31,2
	187	1,30	0,30	-1,00	36,8
	Mittel	1,40	0,76	-0,64	45,7
6 Tage	191	1,42	0,55	-0,87	61,2
	192	2,18	0,27	-1,91	87,6
	193	1,15	0,08	-1,07	93,0
	Mittel	1,85	0,30	-1,55	83,7
9 Tage	194	1,48	0,36	-1,12	75,6
	195	1,11	0,71	-0,40	36,0
	196	1,28	0,10	-1,18	82,1
	Mittel	1,29	0,39	-0,90	69,7
15 Tage	203	1,36	1,03	-0,33	24,2
	204	1,36	1,12	-0,24	17,6
	205	1,17	0,84	-0,33	17,6
	Mittel	1,29	0,99	-0,30	23,2

TABELLE I B.

Cholesterin-Kaninchen

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Glykogen (%)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
3 Tage	188	1,21	0,74	-0,47	38,8
	189	1,43	0,70	-0,73	51,0
	190	1,56	0,90	-0,66	42,4
	Mittel	1,40	0,78	-0,62	44,3
6 Tage	197	1,45	1,41	-0,04	2,6
	198	1,02	0,70	-0,32	31,3
	199	1,65	0,66	-0,99	60,0
	Mittel	1,37	0,92	-0,45	32,8
9 Tage	200	1,50	0,75	-0,75	50,0
	201	1,47	1,01	-0,46	31,2
	202	1,14	1,02	-0,12	10,5
	Mittel	1,37	0,93	-0,45	32,1
15 Tage	206	1,31	1,11	-0,20	15,2
	207	1,18	1,00	-0,18	15,2
	208	1,28	1,25	-0,03	2,3
	Mittel	1,25	1,12	-0,13	10,4

Grad der Abnahme des Glykogens leicht, was wirklich darauf zurückzuführen ist, dass bei gewöhnlicher Kost die Abnahme am 6. und 9. Tage nach der Operation beträchtlich ist, während bei Cholesterinkost in dementsprechender Zeit schon die Rückkehr zum normalen Wert eintritt, so dass die Abnahme nicht einen beträchtlichen Grad erreicht.

2. Anorganische Phosphorsäure.

A. Beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost.

Über die Ergebnisse der Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure unterrichtet Tabelle II A.

Wie Tabelle II A es zeigt, ist die Schwankung am 4. Tage nach der Operation gering, indem sich eine Abnahme von 16% ergibt. Dagegen ist die Abnahme am 6. Tage auffallend, die

TABELLE II A.

norm. Kaninchen					
n. d. Operat.	Tier- Nr.	anorg. Phosphorsäure (mg%)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
4 Tage	57	241,6	282,7	+ 41,1	17,0
	59	328,4	387,6	+ 59,2	18,0
	64	449,9	389,3	- 60,6	13,4
	Mittel	339,9	353,2	+ 13,3	16,2
6 Tage	107	562,8	169,7	- 393,1	69,8
	108	436,4	116,3	- 320,1	73,3
	109	434,4	184,7	- 249,6	57,4
	Mittel	477,8	156,9	- 320,9	67,1
10 Tage	110	556,0	376,1	- 179,9	32,3
	111	553,5	479,1	- 74,4	13,4
	112	471,9	435,4	- 36,5	7,7
	Mittel	527,0	430,2	- 96,8	18,3
15 Tage	113	500,4	488,7	- 11,7	2,3
	114	610,9	445,6	- 165,3	27,0
	115	529,5	546,4	+ 16,9	3,1
	Mittel	546,9	493,5	- 53,4	9,7
20 Tage	116	508,1	506,0	- 2,1	0,4
	117	536,6	502,4	- 34,2	6,3
	118	503,7	427,7	- 76,0	1,5
	Mittel	516,1	478,7	- 37,4	7,2

Menge steigt bis auf etwa $\frac{1}{3}$ der Kontrolle ab. Sie ist am 10. Tage etwas gebessert, aber noch beträchtlich. Auch am 15. Tage ist noch eine Abnahme zu bemerken, deren Grad am 20. Tage geringer wird.

B. Beim Cholesterin-Kaninchen. Über die Ergebnisse unterrichtet Tabelle II B.

Wie aus Tabelle II B hervorgeht, hat am 4. Tage nach der Operation der Mengenwert ein wenig abgenommen, gegenüber der Kontrolle etwa 15% und ist mit dem bei gewöhnlicher Kost gleich. Am 6. Tage kommt es bereits zur Rückkehr, indem der Wert

TABELLE II B.

Cholesterin-Kaninchen

n. d. Operat.	Tier- Nr.	anorg. Phosphorsäure (mg% in fester Subst.)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
4 Tage	98	430,6	488,7	— 58,1	13,4
	99	427,2	297,5	— 129,7	30,3
	100	421,7	300,8	— 120,9	28,6
	Mittel	426,5	362,3	— 64,2	15,0
6 Tage	119	516,8	486,0	— 30,8	5,9
	120	514,4	342,3	— 172,1	33,4
	121	420,5	526,4	+ 105,9	25,1
	Mittel	483,9	451,6	— 32,3	6,6
10 Tage	122	458,8	447,2	— 11,6	2,5
	123	517,7	477,8	— 39,9	7,7
	124	417,2	319,2	— 98,0	23,4
	Mittel	464,6	414,7	— 49,9	10,7
15 Tage	125	539,8	535,5	— 4,3	0,7
	126	425,3	468,6	+ 43,3	10,1
	127	423,8	431,9	+ 8,1	1,9
	Mittel	462,9	478,6	+ 15,7	3,3
20 Tage	128	481,5	408,2	— 73,5	15,2
	129	346,5	405,9	+ 59,4	13,3
	130	491,8	460,0	— 31,8	6,4
	Mittel	439,9	424,7	— 15,2	3,4

gegenüber der Kontrolle eine Abnahme von nur 6% zeigt. Vergleicht man dies mit der Abnahme von 67% bei gewöhnlicher Kost, so entdeckt man eine bedeutend rasche Rückkehr zum normalen Werte. Auch am 10. Tage kommt es nur zu geringer Abnahme, sie ist nach dem 15. Tage kaum zu bemerken. Die obigen Befunde zeigen, dass nach der Gefässunterbindung die Abnahme der anorganischen Phosphorsäure geringer bei der Cholesterinkost als bei gewöhnlicher ist, was meiner Ansicht nach darauf zurückzuführen ist, dass am 6. Tage nach der Operation, wenn bei gewöhnlicher Kost die deutliche Abnahme eintritt, bei Cholesterinkost schon die Rückkehr zum Normalwert stattfindet.

3. Säurelösliche Phosphorsäure.

Die Ergebnisse der Bestimmung der säurelöslichen Phosphorsäure sind folgende:

A. *Beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost.* Die Befunde sind in Tabelle III A angegeben.

Aus Tabelle III A erhellt, dass am 4. Tage nach der Operation die Menge der säurelöslichen Phosphorsäure fast keiner Schwankung unterliegt, jedoch am 6. Tage ihre Abnahme plötzlich beträchtlich wird, indem sie $\frac{1}{4}$ der Kontrolle ergibt. Am 10. und 15. Tage war sie ein wenig gebessert, aber noch beträchtlich. Am 20. Tage war die Abnahme beinahe nicht mehr zu bemerken.

B. *Beim Cholesterin-Kaninchen.* Über die Ergebnisse unterrichtet Tabelle III B.

Nach Tabelle III B zeigt sich schon am 4. Tage nach der Operation eine Abnahme, die am 6. Tage verringert ist, und im Vergleich mit der Kontrolle 13% zeigt. Vergleicht man dies mit der Abnahme von 74% beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung, so kann man einen grossen Unterschied erkennen. Aber am 15. Tage ist die Abnahme der säurelöslichen Phosphorsäure nicht mehr zu bemerken. Beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost kann man in dieser Zeit noch eine deutliche Abnahme feststellen.

Vergleicht man die obigen Ergebnisse beim Cholesterin-Kaninchen mit denen bei Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung, so ergibt sich, dass die nach der Gefässunterbindung aufgetretene

TABELLE III A.

norm. Kaninehen

n. d. Operat.	Tier- Nr.	säurelös. Phosphorsäure (mg% in fest. Subst.)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
4 Tage	57	796,7	750,0	— 46,7	5,9
	59	689,4	766,2	+ 76,8	11,1
	64	716,9	661,5	— 55,4	7,7
	Mittel	736,7	725,9	— 10,8	1,4
6 Tage	107	687,0	266,8	— 420,2	61,1
	108	731,9	146,9	— 585,0	79,9
	109	754,6	142,0	— 612,6	81,1
	Mittel	724,5	185,2	— 539,3	74,4
10 Tage	110	842,1	486,4	— 355,7	42,2
	111	752,7	804,2	+ 51,5	6,8
	112	742,2	661,0	— 81,1	10,9
	Mittel	779,0	650,5	— 128,5	16,1
15 Tage	113	781,2	503,7	— 277,5	35,5
	114	763,4	558,6	— 204,8	26,8
	115	717,9	753,9	+ 36,0	5,0
	Mittel	754,1	605,4	— 148,7	19,7
20 Tage	116	712,2	729,7	+ 17,5	2,4
	117	768,1	685,8	— 83,3	10,8
	118	685,3	649,5	— 35,8	5,2
	Mittel	721,8	688,3	— 33,5	4,6

Abnahme der säurelöslichen Phosphorsäure bei Cholesterinkost gering ist. Dies beruht auf dem Verhältnis, dass beim Cholesterin-Kaninehen die Abnahme sich schon am 6. Tage nach der Operation zur Erholung wendet.

4. Phosphagen.

Die Bestimmung der Schwankung des Phosphagen hat das folgende ergeben.

A. Beim Kaninehen mit gewöhnlicher Nahrung. Die Ergeb-

TABELLE III B.

Cholesterin-Kaninchen					
n. d. Operat.	Tier- Nr.	säurel. Phosphorsäure (mg% in fest. Subst.)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
4 Tage	98	756,4	708,1	- 48,3	6,3
	99	819,1	427,6	-391,5	47,7
	100	772,5	628,0	-144,5	18,4
	Mittel	782,6	587,9	-194,7	24,8
6 Tage	119	756,7	810,5	+ 53,8	7,1
	120	777,1	500,0	-277,1	35,6
	121	835,7	745,8	- 89,9	10,7
	Mittel	789,8	685,4	-104,4	13,2
10 Tage	122	754,0	817,4	+ 63,4	8,4
	123	831,4	844,7	- 36,7	4,0
	124	767,8	411,2	-356,6	46,1
	Mittel	801,6	691,1	-110,5	13,7
15 Tage	125	793,9	790,3	- 3,6	0,4
	126	691,6	748,6	+ 57,0	8,2
	127	806,6	783,8	- 22,8	2,8
	Mittel	764,0	774,2	+ 10,2	1,3
20 Tage	128	843,3	818,6	- 24,7	2,9
	129	727,2	810,1	+ 82,9	11,3
	130	790,6	782,7	+ 7,9	0,9
	Mittel	787,0	803,8	+ 16,8	2,1

nisse sind in Tabelle IV A. gezeigt.

Nach den Ergebnissen der Tabelle IV A zeigt sich am 3. Tage nach der Operation eine 82%ige Abnahme. Die Abnahme ist am 6. Tage ebenfalls beträchtlich, besonders bei den Fällen 218 und 220 mit markanter Nekroseentstehung. Auch am 9. Tage zeigt sich noch eine deutliche Abnahme von 50%. Sie ist auch am 15. und 20. Tage noch zu bemerken.

B. Beim Cholesterin-Kaninchen. Die Ergebnisse sind in

TABELLE IV A.

norm. Kaninchen

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Phosphagen (mg%)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
3 Tage	212	91,2	21,0	-70,2	76,9
	213	72,1	9,8	-62,3	86,4
	214	88,0	12,8	-75,2	85,4
	Mittel	83,7	14,5	-69,2	82,6
6 Tage	218	87,1	3,7	-83,4	95,7
	219	87,1	73,9	-13,2	15,1
	220	82,6	9,6	-73,0	83,3
	Mittel	85,6	29,0	-56,6	66,1
9 Tage	224	97,5	31,9	-65,6	76,6
	225	83,1	40,3	-42,8	51,5
	226	84,2	29,4	-54,8	66,3
	Mittel	88,2	33,8	-44,4	50,3
15 Tage	230	79,3	63,7	-10,6	13,3
	231	80,0	63,5	-11,5	14,3
	232	84,1	40,6	-43,5	51,7
	Mittel	81,1	59,2	-21,9	27,0
20 Tage	236	91,4	51,0	-40,4	44,2
	237	87,3	68,4	-18,9	21,6
	238	85,4	62,3	-23,1	27,0
	Mittel	88,0	60,5	-27,5	31,2

Tabelle IV B angeführt.

Aus Tabelle IV B erhellt, dass am 3. und 6. Tage nach der Operation das Phosphagen eine deutliche Abnahme erfährt, dessen Abnahme mit dem bei gewöhnlicher Kost beinahe gleich ist. Jedoch am 9. Tage beträgt die Abnahme 34%, sie ist geringer als bei gewöhnlicher Nahrung. Während beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost sich auch am 20. Tage eine Abnahme von 31% zeigt, ist sie bei der Cholesterinkost fast nicht zu bemerken.

TABELLE IV B.

Cholesterin-Kaninchen

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Phosphagen (mg%)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
3 Tage	215	94,6	31,5	-63,1	66,8
	216	87,1	42,1	-45,0	51,6
	217	80,5	11,5	-69,0	85,7
	Mittel	87,4	28,3	-59,1	67,6
6 Tage	221	91,7	8,3	-83,4	90,9
	222	82,4	28,3	-54,1	65,6
	223	84,1	40,0	-44,1	52,4
	Mittel	86,0	25,5	-60,5	70,3
9 Tage	227	87,0	53,0	-34,0	39,0
	228	77,8	78,2	+ 0,4	0,5
	229	97,3	41,2	-56,1	57,6
	Mittel	87,3	57,4	-29,9	34,2
15 Tage	233	86,5	49,3	-37,2	43,0
	234	77,2	72,4	- 4,8	6,2
	235	86,4	63,9	-22,5	26,0
	Mittel	83,3	61,8	-21,5	25,8
20 Tage	239	85,8	82,6	- 3,2	3,7
	240	97,2	75,5	-21,7	23,3
	241	80,5	87,2	+ 6,7	8,3
	Mittel	87,8	81,7	- 6,1	6,9

Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass die Abnahme des Phosphagen nach der Gefässunterbindung beim Cholesterin-Kaninchen geringer ist als beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost. Dieses Ergebnis ist auf den Umstand zurückzuführen, dass beim Cholesterin-Kaninchen die Erholung der Phosphagenabnahme schon nach dem 9. Tage nach der Operation eintritt:

5. Kreatin.

Die Bestimmung der Schwankung der Kreatinmenge hat

folgendes ergeben.

A. *Beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost.* Die Ergebnisse sind in Tabelle V A angegeben.

TABELLE V A.

norm. Kaninchen

n. d. Operat.	Tier- Nr.	Kreatin (% in fest. Subst.)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
4 Tage	57	1,940	1,355	-0,585	30,6
	59	1,917	1,600	-0,317	16,5
	64	1,742	0,761	-0,981	56,3
	Mittel	1,866	1,239	-0,627	33,6
6 Tage	107	1,618	0,176	-1,442	89,1
	108	1,640	0,155	-1,485	90,5
	109	1,933	0,161	-1,772	91,6
	Mittel	1,730	0,164	-1,566	90,5
10 Tage	110	2,074	0,833	-1,241	60,0
	111	1,667	1,606	-0,061	3,6
	112	1,830	1,691	-0,139	7,5
	Mittel	1,857	1,372	-0,483	26,0
15 Tage	113	1,716		-1,716	100,0
	114	1,909	1,649	-0,260	13,6
	115	1,986	1,803	-0,183	9,2
	Mittel	1,867	1,150	-0,686	40,9
20 Tage	116	1,506	1,648	+0,142	9,4
	117	1,660	1,815	+0,155	9,3
	118	1,989	1,716	-0,273	13,7
	Mittel	1,718	1,726	+0,008	0,4

Nach den Ergebnissen der Tabelle V A ist bereits am 4. Tage nach der Operation eine Abnahme von 33% zu bemerken, die am 6. Tage beinahe noch dreimal so hoch, 90%, ist. Am 10. Tage kommt es zur Wiederherstellung der abgenommenen Menge, es zeigt sich noch eine Abnahme von 26%, die am 15. Tage, mit Ausnahme

von Fall Nr. 113, bei den sonstigen Fällen sich beinahe der Rückkehr nähert. Bei Nr. 113, bei dem die Nekrose besonders ausgeprägt, der Muskel mumienhaft war, konnte das Kreatin wegen seiner winzigen Menge nicht bestimmt werden. Eine Abnahme war am 20. Tage nicht mehr zu bemerken.

B. *Cholesterin-Kaninchen*. Über die Ergebnisse unterrichtet Tabelle V B.

TABELLE V B.

Cholesterin-Kaninchen					
n. d. Operat.	Tier- Nr.	Kreatin (% in fest. Subst.)			
		norm. Seit.	oper. Seit.	Ab- od. Zunahme	% der Ab- od. Zunahme
4 Tage	98	2,011	0,181	-1,830	90,9
	99	2,339	1,653	-0,686	29,3
	100	2,091	1,769	-0,322	15,3
	Mittel	2,147	1,201	-0,946	44,0
6 Tage	119	2,013	1,927	-0,086	4,2
	120	1,400	1,026	-0,374	26,7
	121	1,787	1,628	-0,159	8,8
	Mittel	1,733	1,527	-0,206	11,8
10 Tage	122	1,882	1,903	+0,021	1,2
	123	2,025	2,015	+0,010	0,4
	124	1,826	1,448	-0,378	20,7
	Mittel	1,911	1,789	-0,122	6,3
15 Tage	125	1,859	1,881	+0,022	1,1
	126	1,832	2,070	+0,338	12,9
	127	1,966	1,653	-0,313	15,9
	Mittel	1,884	1,868	-0,016	0,8
20 Tage	128	2,145	2,003	-0,142	6,6
	129	1,324	1,371	+0,047	3,5
	130	2,196	2,133	-0,063	2,8
	Mittel	1,888	1,836	-0,052	2,7

Aus Tabelle V B ist ersichtlich, dass am 3. Tage nach der Operation die Abnahme von 41% mit der bei Kaninchen mit gewöhnlicher Kost nahezu gleich ist, jedoch am 6. Tage sich eine Abnahme von 11% zeigt. Wenn man diesen Wert mit dem von 90% bei Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung vergleicht, so zeigt

sich ein grosser Unterschied. Die Abnahme von nur 6% am 10. Tage ist im Vergleich mit 26% der gewöhnlichen Kost sehr gering, sie ist nach dem 15. Tage nicht mehr zu beobachten.

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass die Abnahme von Kreatin in dem Muskel des Kaninchens nach der Gefässunterbindung bei der Cholesterinkost geringer als bei gewöhnlicher Kost ist, was auf das Verhältnis zurückzuführen ist, dass bei der Cholesterinkost die Abnahme sich schon am 6. Tage nach der Operation, gegenüber der grossen Abnahme bei gewöhnlicher Kost zur Erholung wendet.

6. *Gesamter löslicher Stickstoff, Reststickstoff und Eiweisstickstoff.*

Nach der Untersuchung von Denticke (1930) wird beim Absterben und bei der Ermüdung des Muskels eine physiochemische Zustandsveränderung des Muskeleiweisskörpers hervorgerufen, es kommt zur beträchtlichen Löslichkeitsverminderung. Ich habe ebenfalls Versuche an dem normalen und Cholesterin-Kaninchen ausgeführt, um zu erfahren, ob nach der Gefässunterbindung in den peripheren Muskeln die gleichen Veränderungen entstehen.

Die Bestimmung wurde wie in den Versuchen von Denticke vorgenommen, indem die Mengen des gesamten löslichen Stickstoffes und Reststickstoffes ermittelt wurden, und die von der ersteren die letztere abgezogene Restmenge als die Menge des löslichen Eiweisstickstoffes bezeichnet wurde. Die Ergebnisse sind die folgenden.

A. Beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI A angeführt.

Nach den Ergebnissen der Tabelle VI A zeigen von 3. bis 9. Tage nach der Operation der gesamte lösliche Stickstoff und Reststickstoff eine Abnahme, ebenso der lösliche Eiweisstickstoff. Am 15. Tage ist die Abnahme nicht mehr zu bemerken.

B. Beim Cholesterin-Kaninchen. Über die Ergebnisse unterrichtet Tabelle VI B.

Wie aus Tabelle VI B ersichtlich ist, erfahren vom 6. bis 9. Tage nach der Operation der gesamte lösliche Stickstoff, Reststick-

TABELLE VI A.

n. d. Operat.	Tier- Nr.	gesamt. lösl. N. (%)				Rest-N. (%)				lösl. Eiweiss-N. (%)			
		norm. Seif.		oper. Seif.		norm. Seif.		oper. Seif.		norm. Seif.		oper. Seif.	
		Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %	Zunahme Ab. od. %
3 Tage	212	1,825	1,909	-0,536	29,1	0,442	0,346	-0,096	21,7	1,393	0,953	-0,440	31,5
	213	1,884	1,158	-0,726	38,5	0,491	0,271	-0,220	44,8	1,393	0,887	-0,506	36,3
	214	1,775	1,003	-0,772	44,1	0,416	0,305	-0,111	26,6	1,359	0,698	-0,661	48,6
	Mittel	1,831	1,129	-0,711	39,3	0,449	0,307	-0,142	31,6	1,381	0,846	-0,535	38,7
6 Tage	218	1,881	1,488	-0,393	20,8	0,416	0,286	-0,130	31,2	1,464	1,293	-0,262	17,8
	219	1,698	1,704	+0,006	0,3	0,414	0,421	+0,007	1,2	1,381	1,283	-0,098	0,1
	220	1,956	0,702	-1,254	64,1	0,524	0,115	-0,409	78,0	1,432	0,687	-0,745	52,0
	Mittel	1,845	1,298	-0,547	29,6	0,451	0,274	-0,177	39,2	1,393	1,057	-0,336	24,1
9 Tage	224	1,841	1,198	-0,643	34,9	0,482	0,228	-0,154	31,9	1,359	0,870	-0,489	34,5
	225	1,825	1,086	-0,849	43,8	0,478	0,288	-0,190	39,7	1,457	0,798	-0,659	45,2
	226	1,829	1,239	-0,620	22,3	0,437	0,301	-0,136	31,1	1,422	0,938	-0,484	34,0
	Mittel	1,875	1,174	-0,701	37,3	0,465	0,305	-0,160	34,4	1,412	0,868	-0,544	37,8
15 Tage	230	1,587	1,755	+0,168	10,5	0,446	0,501	+0,064	14,3	1,141	1,245	+0,104	9,1
	231	1,762	1,687	-0,075	4,2	0,451	0,433	-0,018	3,9	1,311	1,254	-0,057	4,0
	232	1,933	1,976	+0,023	1,1	0,423	0,416	-0,007	1,6	1,510	1,540	+0,030	1,9
	Mittel	1,760	1,799	+0,039	2,2	0,440	0,453	+0,013	2,9	1,320	1,346	+0,026	1,9
20 Tage	236	1,847	2,179	+0,332	17,9	0,479	0,505	+0,026	5,4	1,368	1,674	+0,306	22,3
	237	1,837	1,933	+0,096	5,2	0,450	0,496	+0,046	3,3	1,357	1,437	+0,080	5,9
	238	1,800	1,999	+0,199	11,0	0,439	0,536	+0,097	22,0	1,361	1,463	+0,102	7,4
	Mittel	1,828	2,037	+0,209	11,4	0,466	0,512	+0,046	9,8	1,362	1,524	+0,162	11,1

TABELLE VI B.

Cholesterin-Kaninchen

n. d. Operat.	Tier-Nr.	gesamt. lösl. N. (%)				Rest-N. (%)				lös. Eiweiss-N. (%)			
		norm. Zeit.	oper. Zeit.	Abod. Zunahme	% der Abod.	norm. Seit.	oper. Seit.	Abod. Zunahme	% der Abod.	norm. Seit.	oper. Seit.	Abod. Zunahme	% der Abod.
3 Tage	215	1,917	1,642	-0,275	14,3	0,461	0,391	-0,070	15,1	1,456	1,251	-0,205	14,0
	216	1,847	1,364	-0,483	26,1	0,452	0,402	-0,050	11,0	1,397	0,962	-0,435	31,1
	217	1,765	1,387	-0,378	27,2	0,427	0,259	-0,168	39,3	1,338	1,078	-0,260	19,4
	Mittel	1,842	1,464	-0,379	20,5	0,446	0,350	-0,096	21,5	1,397	1,097	-0,300	21,4
6 Tage	221	1,783	1,103	-0,680	38,1	0,440	0,204	-0,146	23,1	1,343	0,809	-0,534	39,7
	222	1,883	1,044	-0,839	44,5	0,391	0,287	-0,104	26,5	1,492	0,757	-0,735	49,2
	223	1,756	1,027	+0,071	4,0	0,414	0,426	+0,012	2,8	1,342	1,401	+0,059	4,3
	Mittel	1,807	1,024	-0,483	26,7	0,415	0,325	-0,080	19,2	1,393	0,939	-0,453	28,9
9 Tage	227	1,845	1,850	+0,005	0,2	0,412	0,425	+0,012	2,9	1,433	1,425	-0,008	0,5
	228	1,819	1,550	-0,259	14,2	0,418	0,315	-0,103	24,6	1,401	1,245	-0,156	11,1
	229	1,833	1,828	-0,505	27,5	0,468	0,330	-0,138	29,4	1,365	0,998	-0,367	26,1
	Mittel	1,832	1,579	-0,253	13,8	0,432	0,356	-0,076	17,6	1,399	1,222	-0,177	12,6
15 Tage	233	1,753	1,863	+0,110	6,2	0,397	0,417	+0,020	5,9	1,376	1,446	+0,070	6,6
	234	1,816	1,836	+0,020	1,1	0,404	0,442	+0,038	9,4	1,412	1,394	-0,018	12,7
	235	1,824	1,924	+0,110	6,0	0,448	0,475	+0,027	6,9	1,376	1,459	+0,083	6,0
	Mittel	1,797	1,877	+0,080	4,4	0,416	0,444	+0,028	6,7	1,381	1,433	+0,052	3,7
20 Tage	239	1,840	1,995	+0,155	8,4	0,412	0,500	+0,118	28,6	1,428	1,465	+0,037	2,5
	240	1,881	1,932	+0,051	2,7	0,433	0,506	+0,053	11,7	1,428	1,426	-0,002	0,1
	241	1,736	1,918	+0,182	10,4	0,401	0,517	+0,116	28,9	1,335	1,401	+0,066	4,9
	Mittel	1,819	1,928	+0,119	6,5	0,425	0,517	+0,092	21,6	1,397	1,420	+0,023	2,5

stoff und lösliche Eiweissstickstoff eine Abnahme, deren Grad im Vergleich mit Kaninchen bei gewöhnlicher Kost klein, besonders die Abnahme am 9. Tage deutlich verschieden ist, indem der lösliche Stickstoff bei gewöhnlicher Nahrung eine Abnahme von 37% und bei der Cholesterinkost 13% zeigt. Die Abnahme des Reststickstoffes beträgt bei gewöhnlicher Nahrung 34% und bei Cholesteringabe 17%. Der Eiweissstickstoff erfährt bei gewöhnlicher Nahrung eine Abnahme von 37% und bei Cholesterinkost eine solche von 12%.

Aus obigen Ergebnissen geht hervor, dass der lösliche Stickstoff, Reststickstoff und lösliche Eiweissstickstoff des Muskels nach der Gefässunterbindung abnehmen, und dass am 9. Tage nach der Operation, wenn sich bei gewöhnlicher Nahrung noch eine starke Abnahme zeigt, es bei der Cholesterinkost bereits zur Rückkehr kommt, die Abnahme deshalb bei der letzteren gering ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die obigen Ergebnisse lassen sich folgendermassen zusammenfassen.

1. Bei Kaninchen mit gewöhnlicher und Cholesterin-Kost wurde nach der Gefässunterbindung der Unterextremität die Bestimmung von Glykogen, anorganischer Phosphorsäure, säurelöslicher Phosphorsäure, Phosphagen, gesamtem löslichen Stickstoff, Reststickstoff und löslichem Eiweissstickstoff in den peripheren Muskeln vorgenommen.

2. Glykogen: Der Grad der Abnahme ist bei Cholesterinkost leichter als bei gewöhnlicher Kost, nämlich bei normaler Kost ist die Abnahme am 6. und 9. Tage beträchtlich, dagegen wendet sie sich bei der Cholesterinkost in diesen Zeiten bereits der Rückkehr zu, so dass dabei nur eine geringe Abnahme eintritt.

3. Anorganische Phosphorsäure: Beim Cholesterin-Kaninchen zeigt sie eine geringere Abnahme als beim Kaninchen mit gewöhnlicher Kost. Am 6. Tage nach der Operation hat sie beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung deutlich abgenommen, während sie sich beim Cholesterin-Kaninchen in dieser Zeit bereits der Erholung zuwendet, ohne dass sie zu einem beträchtlichen

Grad kommt.

4. Säurelösliche Phosphorsäure: Die Abnahme ist beim Cholesterin-Kaninchen geringer als beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung. Beim Cholesterin-Kaninchen wendet sie sich schon am 6. Tage nach der Operation, wenn sich beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung die grösste Abnahme zeigt, der Rückkehr zu. Infolgendessen tritt bei der Cholesterinkost keine auffallende Abnahme ein.

5. Phosphagen: Beim Cholesterin-Kaninchen ist die Abnahme geringer als beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung, und wendet sich bei ihm am 6. Tage nach der Operation, wenn die Abnahme beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung noch hoch ist, der Erholung zu, so dass die Abnahme bei ihm klein ist.

6. Kreatin: Beim Cholesterin-Kaninchen ist die Abnahme geringer als beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung, und wendet sich bei ihm am 6. Tage nach der Operation, wenn die Abnahme beim Kaninchen mit gewöhnlicher Nahrung noch beträchtlich ist, der Rückkehr zu, deshalb erreicht sie keinen beträchtlichen Grad.

7. Gesamter löslicher Stickstoff, Reststickstoff und löslicher Eiweissstickstoff: Bei gewöhnlicher Nahrung ist auch am 9. Tage nach der Operation die Abnahme noch beträchtlich, während sie sich bei der Cholesterinkost in dieser Zeit der Erholung zuwendet. Deshalb beträgt die Abnahme bei der letzteren nicht einen auffallenden Grad.

Die obigen Ergebnisse führen zu folgendem Schluss.

1. Nach der Blutgefässunterbindung zeigen Glykogen, anorganische Phosphorsäure, säurelösliche Phosphorsäure, Phosphagen, Kreatin, gesamter löslicher Stickstoff, Reststickstoff und löslicher Eiweissstickstoff in den peripheren Muskeln eine Abnahme.

2. Die Rückkehr zur normalen Menge der obigen Substanzen ist bei der Cholesterinkost viel schneller als bei der normalen Kost.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

- Denticke (1930): Pfl. Arch., 224, 1.
Fiske-Subbarow (1925): J. biol. Chem., 66, 375.
Folin-Wu (1919): J. biol. Chem., 38, 98.
Fujita-Iwatake (1932): Bioch. Z., 242, 43.
Lehnartz (1929): Z. physiol. Chem., 184, 19.
Saito (1939): J. Biochem., 31, 143.
Suto (1931): Mediz.-Mikromethode (Japanisch), 224, I Aufl.
Tomita (1936): Keio-Igaku (Japanisch), 16, 277.

ÜBER DEN NERVÖSEN EINFLUSS AUF DIE ENTSTEHUNG VON FETTLIEBER BEI DER VERGIFTUNG.

VON

SEIICHI OHTA.

(Aus den mediz.-Chem. Institut der Keiō-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Y. Sacyoshi.)

(Eingegangen am 25. Dezember 1939)

I. EINLEITUNG.

Nach den Beobachtungen von Wertheimer (1926) kommt die Fettleber bei Phlorrhizinhunden nicht zustande, wenn das Rückenmark an der Stelle über dem VI Brustwirbel durchschnitten wird. Diese Tatsache ist von ihm als Folge des Verschwindens der nervösen Regulation erklärt worden. Rosenthal (1930) dagegen erklärte es dahin, dass vom VI. Brustwirbel die die Insulinproduktion hemmenden Nerven zu Pankreas verlaufen, und dass wegen der Durchtrennung dieser Nerven die Insulinwirkung sich steigern lässt und dadurch die Fettleber nicht zustandekommt. Wertheimer (1931), der daraufhin, um die Rosenthalsche Ansicht zu versichern, bei Hunden das Rückenmark an der Stelle über dem VI. Brustwirbel durchtrennt hat, führte an, dass es zu keinem Blutzuckerabstieg, somit zu keiner Verstärkung der Insulinwirkung gekommen ist.

Da bei darartiger Durchschneidung des Rückenmarkes an der Stelle über dem VI. Brustwirbel noch nicht bekannt ist, welcher Mechanismus die Hemmung der Fettleberentstehung bei Phlorrhizinvergiftung bewirkt, habe ich es in dieser Untersuchung zu klären versucht. Ich (1939) habe mich schon früher mit der Entstehung der Phlorrhizinfettleber bei weissen Ratten befasst; da aber die Fälle, bei denen die Fettleber zustandegekommen war, gering an Zahl waren, auch nach der Rückenmarksdurchschneidung, wenn Phlorrhizin einverleibt wurde, meistens zugrunde

gingen, habe ich, weil für meinen obigen Zweck zahlreiche Versuche nicht zu umgehen sind, die Fettleber durch die Phosphorvergiftung zu erzeugen versucht.

II. UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODE.

Bei weissen Ratten wurde der Wirbelbogen an geeigneter Stelle mit dem Processus spinalis entfernt und das dadurch zum Vorschein gekommene Rückenmark durchtrennt. Die Bestimmung der Fettmenge wurde nach der Kumagawa-Suto'schen Methode (1908) vorgenommen.

1. Versuch.

Für die Kontrollprüfung wurde die Leberfettmenge der normalen Ratte bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I wiedergegeben.

TABELLE I.

Tier-Nr.	Leberfett (%)
1	3,26
2	2,83
3	3,60
4	3,85
5	4,03
Mittel	3,55

Nach den Ergebnissen der Tabelle I beträgt die Leberfettmenge der normalen Ratte 2,8–4,0% und im Durchschnitt 3,5%.

Um die Schwankung der Leberfettmenge nach dem Hungern dieser Ratten zu kennen, wurde die Bestimmung nach zwei- und dreitägigem Hungern vorgenommen. Die gewonnenen Resultate sind in Tabelle II und III zusammengestellt.

TABELLE II.

Tier-Nr.	Leberfett (%) (2 tätig. Hunger)
6	2,43
7	3,12
8	3,32
Mittel	2,95

TABELLE III.

Tier-Nr.	Leberfett (%) (3 tätig. Hunger)
9	2,67
10	2,86
11	2,77
Mittel	2,73

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Tabelle II und III können wir feststellen, dass die Leberfettmenge nach zweitägigem Hungern (Tabelle II) 2,4–3,3% und im Durchschnitt 2,9%, und nach dreitägigem Hungern (Tabelle III) 2,6–2,8% und im Durchschnitt 2,7% beträgt, und dass die Ergebnisse mit dem Prozentwert von 3,5% der normalen Ratte verglichen, eine allmähliche Abnahme der Leberfettmenge durch Hungern zeigen.

2. Versuch.

Als dann wurde, um den Einfluss auf das Leberfett bei der Durchschneidung des Rückenmarkes zu kennen, nach der Durchtrennung des Rückenmarkes in Höhe des II. Brustwirbels die Messung der Leberfettmenge nach einer bestimmten Zeit vorgenommen.

a) Bei den Ratten, bei denen in obiger Weise das Rückenmark durchschnitten und denen gewöhnliche Nahrung dargereicht war, wurde die Leberfettmenge einen sowie zwei Tage nach der Durchschneidung gemessen; die Messungsergebnisse sind respektiv in Tabelle IV und V angegeben.

TABELLE IV.

(1 Tag. n. d. Durchscheid.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
12	3,26
13	2,58
14	2,30
15	3,24
16	3,62
17	4,48
Mittel	3,41

TABELLE V.

(2 Tage n. d. Durchscheid.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
18	3,00
19	2,88
20	2,25
21	3,85
22	3,57
23	3,25
Mittel	3,13

Nach den Ergebnissen der Tabelle IV beträgt die Leberfettmenge 2,3–4,5% und im Durchschnitt 3,4%; nach Tabelle V beträgt sie 2,2–3,8% und durchschnittlich 3,1%; sie ist demnach nahezu gleich der bei normalen Ratten. So wurde festgestellt, dass trotz

der Durchschneidung des Rückenmarkes in Höhe des II. Brustwirbels die Leberfettmenge keinerlei Beeinflussung erfährt.

b) Bei Ratten, denen nach eintägigem Hungern das Rückenmark durchgeschnitten war, wurde das Hungern für eine bestimmte Zeit fortgesetzt und die Leberfettmenge bestimmt. Die Ergebnisse über das eintägige Hungertier nach der Rückenmarksdurchschneidung (ganze Hungerdauer: 2 Tage) zeigt Tabelle VI und die des zweitägigen (ganze Hungerdauer: 3 Tage) zeigt Tabelle VII.

TABELLE VI.

(1 Tag n. d. Durchscheid.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
24	2,66
25	3,43
26	2,81
27	2,60
28	3,20
Mittel	2,94

TABELLE VII.

(2 Tage n. d. Durchscheid.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
29	2,80
30	3,15
31	3,58
32	2,64
33	2,99
Mittel	3,03

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Tabelle VI können wir feststellen, dass sich eine Leberfettmenge von 2,6–3,4% und im Durchschnitt 2,9%, bei Tabelle VII eine solche von 2,6–3,5% und im Durchschnitt 3,0% bestimmen liess. Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich mit denen beim Hungern des schon erwähnten normalen Tieres keinen grossen Unterschied, d. h. auch in diesem Falle blieb die Leberfettmenge durch die Rückenmarksdurchschneidung unbeeinflusst.

3. Versuch.

Es wurde nun der Einfluss der Rückenmarksdurchschneidung auf die Phosphorvergiftung untersucht.

Für die Phosphorinjektionslösung diente gelber Phosphor, der im Verhältnis von 0,5% in Olivenöl gelöst worden war. Davon wurde je 0,01 ccm pro 10 g Körpergewicht subkutan einverleibt.

Dass die Entstehung der Fettleber durch die Phosphorver-

giftung beim Hungertier stärker als beim Fütterungstier sich zeigt, ist schon von vielen Forschern erwiesen worden. Ich habe daher für die Leberfettbestimmung das Tier vor der Injektion einen Tag hungern lassen und habe auch nach der Injektion das Hungern fortgesetzt. Die Resultate bei der eintägigen Hungerratte nach der Phosphorinjektion sind in Tabelle VIII A und die bei der zweitägigen in der Tabelle VIII B angegeben.

TABELLE VIII.

(A)		(B)	
(1 Tag n. d. P-Injekt.)		(2 Tage n. d. P-Injekt.)	
Tier-Nr.	Leberfett (%)	Tier-Nr.	Leberfett (%)
34	4,40	40	11,03
35	8,59	41	12,46
36	5,75	42	4,96
37	4,50	43	10,60
38	5,45	44	6,57
39	4,29	45	8,77
Mittel	5,49	Mittel	9,06

Wie aus Tabelle VIII A klar hervorgeht, kommt die Fettleber beim der eintägigen Hungerratte nach der Phosphorinjektion nur schwach zum Ausdruck, während sie bei der zweitägigen deutlich zustandegekommen ist.

Um die Frage zu klären, ob die Entstehung der Fettleber bei obiger Phosphorvergiftung durch Durchschneidung des Rückenmarkes beeinflusst wird, habe ich die nachstehenden Versuche ausgeführt.

An eintägigen Hungerratten wurde in verschiedener Höhe das Rückenmark durchschnitten, zugleich den Phosphor einverleibt und beim 1. und 2. Tage nach der Einverleibung das Leberfett bestimmt. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen die Tabellen IX-XIV; Tabelle A veranschaulicht die Ergebnisse nach 1 Tage und Tabelle B die nach 2 Tagen.

TABELLE IX.

(Durchschnitt. in d. Höhe d. II. Brustwirb.)

(A)

(1 Tag n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
46	2,92
47	3,21
48	2,89
49	3,72
50	2,87
Mittel	3,12

(B)

(2 Tage n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
51	2,45
52	3,02
53	3,03
54	3,26
55	2,60
Mittel	2,87

TABELLE X.

(Durchschnitt. in d. Höhe d. V. Brustwirb.)

(A)

(1 Tag n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
56	3,32
57	3,14
58	3,02
Mittel	3,16

(B)

(2 Tage n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
59	3,04
60	3,15
61	2,53
Mittel	2,91

TABELLE XI.

(Durchschnitt. in d. Höhe VII. Brustwirb.)

(A)

(1 Tag n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
62	4,02
63	2,99
64	3,16
Mittel	3,35

(B)

(2 Tage n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
65	3,87
66	2,30
67	3,41
Mittel	3,19

TABELLE XII.

(Durchschnitt. in d. Höhe d. X. Brustwirb.)

(A)

(B)

(1 Tag n. d. P-Injekt.)

(2 Tage n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
68	5,19
69	5,59
70	2,51
71	8,15
Mittel	5,28

Tier-Nr.	Leberfett (%)
72	3,12
73	9,09
74	3,13
75	5,35
Mittel	5,14

TABELLE XIII.

(Durchschnitt. in d. Höhe d. XII. Brustwirb.)

(A)

(B)

(1 Tag n. d. P-Injekt.)

(2 Tage n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
76	2,03
77	6,02
78	4,74
79	5,39
80	4,97
Mittel	4,63

Tier-Nr.	Leberfett (%)
81	14,41
82	9,82
83	4,06
84	6,27
85	6,52
Mittel	8,21

TABELLE XIV.

(Durchschnitt. in d. Höhe d. II. Lendenwirb.)

(A)

(B)

(1 Tag n. d. P-Injekt.)

(2 Tage n. d. P-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
86	4,03
87	9,85
88	6,35
89	3,79
90	4,77
Mittel	5,75

Tier-Nr.	Leberfett (%)
91	13,82
92	6,84
93	10,24
94	5,70
Mittel	9,15

Beim Überblicken der Ergebnisse in Tabelle IX-XI stellen wir fest, dass bei der Rückenmarksdurchtrennung in Höhe des II.

V. und VII. Brustwirbels die Fettleber nicht zustandegekommen ist, d. h. die Fettmenge nahe dem normalen Werte liegt, während bei der Durchschneidung in Höhe des X. Brustwirbels (Tabelle XII A), wie bei Nr. 68 und 69, die Fettmenge einen Wert von je 5,19% und 5,59% zeigt, also einen höheren als der normale; besonders bei Nr. 71 deutet der Wert von 8,15% die deutliche Entstehung der Fettleber an, was sich bei Nr. 73 (Tabelle XII B) mit 9,09% noch mehr offenbart. Unterhalb von diesen Brustwirbeln, d. h. auch bei der Durchschneidung in Höhe des XII. Brust- (Tabelle XIII) und II. Lendenwirbels (Tabelle XIV) wurde ebenfalls die Fettleberentstehung nachgewiesen.

Wenn wird die obigen Ergebnisse zusammenfassen, kommen wir zur folgenden Feststellung: Bei der Durchschneidung des Rückenmarkes in Höhe des VII. Brustwirbels kann die Entstehung der Fettleber durch Phosphorvergiftung gehemmt werden, aber nicht bei der Durchschneidung in Höhe unterhalb des X. Brustwirbels.

4. Versuch.

Es ist schon von vielen Forschern bewiesen, dass die Fettleber durch die Phosphorvergiftung schwer zustandekommt, wenn die Leber reich an Glykogen ist.

Da der Gedanke nahe liegt, dass das Glykogen in der Leber, welches gewöhnlich beim Hungern abnimmt, bei der Rückenmarksdurchschneidung nicht abnimmt, somit in der Leber noch reichliches Glykogen vorhanden ist, und dass bei Durchschneidung des Rückenmarkes die Nichtentstehung der Fettleber durch Phosphorvergiftung auf die reichliche Glykogenmenge in der Leber zurückzuführen ist, wurde eine Untersuchung in dieser Richtung vorgenommen.

An normalen Ratten und zwei- und dreitägigen Hungerratten wurde die Glykogenmenge in der Leber bestimmt; auch wurde bei der zweitägigen Hungerratte nach der Durchschneidung des Rückenmarkes in Höhe des II. Brustwirbels die Glykogenmenge in der Leber bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen XV A, B, C und D wiedergegeben.

TABELLE XV.

(A) (norm. Ratte)		(B) (2 Tage gehunger. Ratte)	
Tier-Nr.	Leberglykogen (%)	Tier-Nr.	Leberglykogen (%)
95	1,04	101	0,33
96	1,69	102	0,37
97	3,13	103	0,33
98	1,52	104	0,41
99	1,65	105	0,30
100	2,02	106	0,39
Mittel	1,84	Mittel	0,35

(C) (3 Tage gehunger. Ratte)		(D) (operiert. Ratte)	
Tier-Nr.	Leberglykogen (%)	Tier-Nr.	Leberglykogen (%)
107	0,28	113	0,20
108	0,09	114	0,24
109	0,08	115	0,11
110	0,08	116	0,29
111	0,11		
112	0,11		
Mittel	0,12	Mittel	0,22

Beim Vergleich der Ergebnisse in Tabelle XVB und D, können wir feststellen, dass die Leberglykogenmenge der Ratte mit durchschnittenen Rückenmark 0,22%, und die der Fälle ohne Durchtrennung 0,35% zeigt, die Glykogenmenge überall klein und der Unterschied zwischen beiden gering ist. Es wurde somit geklärt, dass das Nichtzustandekommen der Vergiftungsfettleber bei der Brustmarkdurchtrennung nicht auf das Vorhandensein reichlicher Menge von Glykogen in der Leber zurückzuführen ist, sondern andere Gründe dafür vorhanden sein müssen.

Nach den Versuchen von Kure, Oi und Okinaka (1937) kann man es so erklären, dass der *N. sympathicus* die Wirkung verrät, die Dissimilation des Fettes im Gewebe zu fördern. Da die Phosphorfettleber infolge der Wanderung des Depotfettes in

die Leber zustandekommt, kann man denken, dass die Wirkung des Sympathicus diese Wanderung fördert. Von Interesse ist in diesem Zusammenhange, dass bei der Phosphorvergiftung N. Splanchnicus gereizt wird und als Folge dieser Reizung die Vermehrung der Adrenalinproduktion in der Nebenniere und dementsprechend die Hyperglykämie in Betracht kommt (Abderhalden: 1920). Ferner übt das Adrenalin auf dem N. Sympathicus eine starke Reizwirkung aus. Es ist in der Tat so, dass beim Zustandekommen der Fettleber durch Phosphorvergiftung die Erregung der Sympathicuswirkung eine bedeutsame Rolle spielt.

Die Nichterregung der Sympathicuswirkung, trotz der Phosphorinjektion, könnte dadurch bedingt worden sein, dass der vom VI.-IX. Brustganglion des Grenzstranges entspringende N. splanchnicus durch die Durchschneidung des Rückenmarkes an der Stelle über diesen Ganglion in seiner Wirkung ausgeschaltet wird und es somit zur Steigerung der Adrenalinproduktion der Nebennieren nicht kommt. Aus obigem Grund kann man verstehen, dass die Fettleber dann durch Phosphorvergiftung zustandekommt, wenn man das Rückenmark in der Höhe unterhalb des X. Brustganglion des Grenzstranges durchtrennt.

Um dies zu sicher zu stellen, machte ich einen Versuch, der zeigen sollte, dass auch bei der Durchschneidung des Rückenmarkes an der Stelle des II. Brustwirbels die Fettleber hervorgerufen werden kann, wenn Adrenalin injiziert wird.

Normalen Ratten wurde zunächst 0,1% salzsaures Adrenalin in einer Menge von 0,002 ccm pro 10 g Körpergewicht injiziert und die Bestimmung der Leberfettmenge nach zwei Tagen vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle XVI wiedergegeben.

TABELLE XVI.

Tier-Nr.	Leberfett (%)
117	2,02
118	2,66
119	1,30
120	3,71
121	2,05
Mittel	2,35

Vergleichen wir die Ergebnisse in der Tabelle XVI mit denen der Tabelle II, so sehen wir, dass trotz der Injektion von Adrenalin die Leberfettmenge nicht auffallend beeinflusst ist.

Alsdann wurde nach eintägigem Hungern in Höhe des II. Brustwirbels durchtrennt und gleich, wie im vorigen Versuch, Adrenalin injiziert und die Leberfettmengebestimmung weiter nach eintägigem Hungern vorgenommen. Es wurden dabei die Ergebnisse der Tabelle XVII gewonnen.

TABELLE XVII.

Tier-Nr.	Leberfett (%)
122	2,47
123	2,51
124	2,05
125	2,61
126	1,05
Mittel	2,11

Nach den Ergebnissen der Tabelle XVII ist bei der Durchschneidung des Rückenmarkes in der II. Brustwirbelhöhe und Adrenalininjektion die Leberfettmenge keiner grossen Veränderung unterworfen.

Es wurde nun bei der eintägigen Hungerratte ohne Rückenmarksdurchschneidung die Phosphorvergiftung hervorgerufen und, wie im vorigen Versuch, Adrenalin injiziert und nach einem eintägigen Hungern die Leberfettmenge bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle XVIII wiedergegeben.

TABELLE XVIII.

(1 Tag n. d. P u. Adren.-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
127	6,25
128	6,05
129	5,12
130	4,78
131	7,13
Mittel	5,86

Nach den Ergebnissen in Tabelle XVIII beträgt die Leberfettmenge 4,7–7,1% und im Durchschnitt 5,8%. Diese Resultate haben mit den obigen Ergebnissen bei der Hungerratte (Tabelle VIII A) in gleichem Sinne eine Phosphorfettleber erzeugt.

Sodann wurde das Rückenmark des eintägigen Hungertiers in Höhe des II. Brustwirbels durchschnitten und die Phosphorvergiftung hervorgerufen; ausserdem wurde, wie im vorigen Versuch, Adrenalin injiziert und die Bestimmung des Leberfettes wurde nach eintägigem Hungern vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle XIX zusammengestellt.

TABELLE XIX.
(1 Tag n. d. P u. Adren.-Injekt.)

Tier-Nr.	Leberfett (%)
132	10,41
133	7,08
134	5,23
135	4,95
136	3,95
137	8,20
138	4,13
139	4,85
Mittel	6,39

Wie Tabelle XIX zeigt, diess sich, mit Ausnahme der Fälle Nr. 136 und 138, immer eine Zunahme der Leberfettmenge nachweisen, die besonders beträchtlich bei Nr. 132, 133 und 137 war, mit einer durchschnittlichen Fettmenge von 6,4%. Die Ergebnisse zeigen klar, dass die Fettleber zustandegekommen ist.

Die obigen Ergebnisse haben bestätigt, dass bei der Rückenmarksdurchschneidung die Fettleber durch Phosphorvergiftung nicht hervorgerufen werden kann, diese wirklich ähnlich wie bei der Nichtdurchtrennung des Rückenmarkes zustandekommt, wenn Adrenalin injiziert wird. Es liegt daher der Gedanke nahe, dass das Nichtzustandekommen der Fettleber bei der Rückenmarksdurchschneidung vielleicht auf die Nichterregung der Sympathicuswirkung zurückzuführen ist.

5. Versuch.

Wie die oben beschriebenen Versuche gezeigt haben, kommt bei den Tieren mit Rückenmarksdurchneidung in Höhe des II. Brustwirbels durch Phosphorvergiftung die Fettleber nicht zustande. Das ist wohl darauf zurückzuführen, dass als Folge der Rückenmarksdurchschneidung die Produktion des Adrenalins nicht vermehrt und dementsprechend auch die Wirkung des Sympathicus nicht verstärkt wird. Es ist somit das Verhältnis verständlich, dass die Phosphorfettleber selbst bei der Rückenmarksdurchtrennung durch die Injektion von Adrenalin wohl zu erzeugen ist.

Um diesen Zusammenhang noch klären zu zeigen, habe ich mit dem, gleich wie Adrenalin, den Sympathicus reizenden Ephedrin Versuche ausgeführt, indem ich bei dem eintägigen Hundertier in Höhe des II. Brustwirbels das Rückenmark durchschnitt, gleichzeitig mit der Injektion von Phosphor das Ephedrin (4%) 0,02 ccm pro 10 g Körpergewicht einverleibte, dann das Tier für einen Tag hungern liess und die Leberfettmenge bestimmte. Die gewonnenen Resultate zeigt Tabelle XX.

TABELLE XX.

Tier-Nr.	Leberfett (%)
140	7,5
141	6,7
142	8,8
143	4,9
144	5,4
145	8,1
146	5,2
147	4,9
Mittel	6,4

Die Ergebnisse in Tabelle XX, nach denen die Leberfettmenge 4,9-8,8% und im Durchschnitt 6,4% beträgt, zeigen klar die Entstehung der Fettleber an. Somit wurde nachgewiesen, dass bei dem Tier mit durchschnittenem Rückenmark durch Phosphorver-

giftung die Fettleber nicht erzeugt werden kann, durch Einverleibung des den Sympathicus reizenden Mittels diese wirklich hervorgerufen werden kann.

6. Versuch.

Im 4. Versuch wurde beobachtet, dass bei dem Tier mit durchschnittenem Rückenmark die Phosphorfettleber durch die Injektion von Adrenalin zu erzeugen ist, was wahrscheinlich auf die den Sympathicus reizende Wirkung des Adrenalin zurückzuführen ist. Um dieses Verhältnis noch sicherer nachzuweisen, habe ich das den Sympathicus lähmende Mittel "Ergotoxin" zugleich mit dem Adrenalin benützt. Die Versuche wurden an eintägigen Hungerratten ausgeführt, indem in der Höhe des II. Brustwirbels das Rückenmark durchschnitten, zugleich mit der Injektion von Phosphor das Adrenalin (0,01%) pro 10 g Körpergewicht 2 ccm und die Ergotoxinlösung (0,01%) pro 10 g 0,06 ccm einverleibt und nach weiter eintägigem Hungern die Leberfettmenge bestimmt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle XXI wiedergegeben.

TABELLE XXI.

Tier-Nr.	Leberfett (%) -
148	4,1
149	3,7
150	2,7
151	3,2
152	3,0
153	3,9
154	2,4
155	2,5
Mittel	3,2

Die Ergebnisse in Tabelle XXI, nach denen die Leberfettmenge 2,4-4,1% und im Durchschnitt 3,2% beträgt, lassen eine Entstehung der Fettleber nicht erkennen. Aus dem Ergebnisse, dass bei der gleichzeitigen Injektion von Adrenalin und Ergotoxin die Fettleber nicht entsteht, versteht man natürlich, dass die

die Fettleber erzeugende Wirkung des Adrenalins in seiner den Sympathicus reizenden Tätigkeit besteht.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Wenn man das Rückenmark der Ratte in verschiedener Höhe des Brustwirbels durchschneidet, kommt bei der Phosphorvergiftung die Fettleber nicht zustande, während ihr Entstehen bei der Durchtrennung des Rückenmarkes an der Stelle unterhalb des X. Brustwirbels beobachtet wird.

2. Da bekanntlich bei reichlicher Glykogenmenge in der Leber die Fettleber schwer entsteht, so habe ich bei dem Falle, bei dem infolge der Durchtrennung des Rückenmarkes die Fettleber nicht entsteht, den Glykogengehalt der Leber bestimmt; es ergab sich aber dabei, dass das Glykogen in der Leber, gleich wie bei der Nichtdurchtrennung des Rückenmarkes, infolge des Hungerns bis auf eine geringe Menge abnimmt. Es hat sich somit gezeigt, dass das Nichtzustandekommen der Fettleber nicht von der Glykogenmenge beeinflusst wird.

3. Nach Kure u. a. besitzt der N. sympathicus eine die Dissimilation des Fettes fördernde Wirkung. Die Tatsache, dass die Fettleber bei der Rückenmarkdurchtrennung nicht zustandekommt, lässt sich dadurch erklären, dass es bei der Rückenmarkdurchschneidung zur Aufhebung der Reizwirkung von Phosphor auf den N. Splanchnicus kommt und dementsprechend die Adrenalinproduktion nicht mehr steigt, und dann auch keine Erregung der Sympathicuswirkung zeigt und dadurch die Wanderung von Depotfett in die Leber erschwert wird. Um dies nachzuweisen, wurde bei dem Tier mit durchschnittenem Rückenmark das Adrenalin zugleich mit dem Phosphor einverleibt; wie aus diesen Versuchen hervorgeht, kam die Fettleber deutlich zustande, die sich auch bei Ephedrin, das an Stelle von Adrenalin enverleibt wurde, in gleichem Sinne äusserte.

4. Die Fettleber kommt aber dann nicht zustande, wenn man gleichzeitig mit dem Adrenalin das den Sympathicus lähmende Mittel Ergotoxin injiziert.

Die obigen Tatsachen führen zu folgendem Schluss:

1. Die Nichtentstehung der Phosphorfettleber bei der Rückenmarksdurchschneidung ist eine Folge der Nichterregung der Sympathicuswirkung, welche durch die Abschwächung der Reizwirkung auf die Adrenalinproduktion zustandekommt.

2. Der Sympathicus zeigt in der Dissimilation des Fettes eine bedeutsame Wirkung.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

- Abderhalden (1920): Lehrbuch d. physiol. Chem. IV aufl. 169.
Kumagawa-Suto (1908): Bioch. Z., 8, 212.
Kure, Oi u. Okinaka (1937): Klin. Wochensh., 16, 1789.
Ohta (1939): Keio-Igaku (Japanisch), 19, 1043.
Rosenfeld (1930): Hannyn-Schmied. Arch., 157, 149.
Wertheimer (1926): Pfl. Arch., 213, 262.
Wertheimer (1931): Hannyn-Schmied, Arch., 160, 177.

ÜBER DIE FETTMENGE IN DER LEBER BEIM HUNGERN.

VON

SEIICHI OHTA.

(Aus dem mediz.-Chemischen Institut der Keiō-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 25. Dezember 1939)

I. EINLEITUNG.

Nach den Untersuchungen von Higuchi (1924) kommt es beim Hungern der Maus zu einer Zunahme der Leberfettmenge, Monaghan (1932) führte über Ratten auch die gleichen Ergebnisse an; Sinclair (1933) dagegen beobachtete eine Abnahme der Leberfettmenge, auch Koyama (1937) konnte eine Zunahme der Leberfettmenge nicht beobachten. Ich (1940) habe ebenfalls die gleichen Resultate wie Sinclair erhalten. Diese entgegengesetzten Resultate beim Hungern legen den Gedanken nahe, dass die Zu- oder Abnahme der Leberfettmenge auf den Einfluss der Jahreszeiten, in welchen die Versuche ausgeführt wurden, zu rückzuführen ist. Weil die Versuche von Higuchi im Frühling, die von Koyama und die meinigen im Winter durchgeführt worden sind. Um dies zu klären, habe ich die nachstehenden Versuche vorgenommen.

II. UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODE.

1. Die Versuchsratten wurden 3 Wochen vorher mit Reis und Gemüse aufgezogen, während des Hungerns wurde ihnen nur Wasser verabreicht.

2. Die Leberfettbestimmung wurde nach der Kumagawa-Suto-Methode (1908) vorgenommen.

III. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

Versuch 1.

Ich habe in der warmen Jahreszeit, im Juni (höchste Temperatur 25,8°, niedrigste Temperatur 17,8°, durchschnittlich 21,5°) beim Hungern des Tieres die Zu- und Abnahme des Leberfettes gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle I.

TABELLE I.

Tier	Tier-Nr.	Leberfett (%)
norm.	1	4,88
	2	2,96
	3	4,03
	Mittel	3,95
Hunger (1. Tag)	4	14,96
	5	7,12
	6	9,21
	7	5,85
	8	14,76
	9	13,49
	10	19,40
	Mittel	12,11
	11	7,51
	12	10,35
Hunger (2. Tag.)	13	10,60
	14	6,50
	15	3,60
	16	7,23
	17	3,02
	18	12,27
	Mittel	8,17
Hunger (3. Tag.)	19	2,43
	20	1,13
	21	1,94
	22	3,29
	23	3,78
	24	2,39
	25	3,53
	Mittel	2,64

Nach Tabelle I beträgt der Leberfettgehalt der normalen Ratte durchschnittlich 3,95%, zeigt aber am 1. Hungertage eine auffällige Zunahme auf 12,11% im Durchschnitt. Am 2. Hungertage hat die Leberfettmenge etwas abgenommen im Vergleich mit der am 1. Hungertage, indem sie 8,17% ergibt, jedoch zeigt sie im Vergleich zu der der normalen Ratte noch die doppelte Mengenzunahme.

Am dritten Hungertage beträgt sie durchschnittlich 2,64%, in dem sie unter den normalen Wert herabsinkt.

Nach den obigen Versuchen konnte man beim Hungertier eine auffällige Zunahme der Leberfettmenge beobachten.

Alsdann wurden die gleichen Versuche im Juli und August (höchste Temp. 28,3°, niedrigste Temp. 20,7°, durchschnittlich 26,6°) ausgeführt. Es wurden die Ergebnisse in Tabelle II erhalten.

TABELLE II.

Tier	Tier-Nr.	Leichenfett (%)	Leberfett (%)
norm.	26	10,21	4,98
	27	11,53	4,89
	28	11,22	3,46
	Mittel	10,98	4,44
Hunger (1. Tag)	29	8,94	12,58
	30	2,34	27,80
	31	7,16	13,86
	Mittel	6,14	18,07
Hunger (2. Tag.)	32	5,09	3,91
	33	7,01	16,57
	34	7,12	6,79
	Mittel	6,40	9,09
Hunger (3. Tag.)	35	2,48	4,52
	36	2,03	5,02
	37	2,44	2,23
	Mittel	2,31	3,92
Hunger (4. Tag.)	38	1,52	1,35
	39	2,91	1,64
	40	2,25	1,65
	Mittel	2,22	1,54

In Tabelle II ist die Zunahme der Leberfettmenge, wie im vorigen Versuch, auffallend, nämlich bei der normalen Ratte beträgt sie 4,41% im Durchschnitt, dagegen zeigt sie durchschnittlich am 1. Hungertage 18,07%, am 2. Hungertage noch 9,09%, am 3. Hungertage 3,92% und am 4. Hungertage ist sie auf 1,52% abgesunken.

Die obigen Ergebnisse zeigen am 1. Hungertage die vierfache Zunahme der Leberfettmenge, verglichen mit dem Werte der normalen Ratte, und am 2. Hungertage noch das Doppelte.

Die Körperfettmenge der normalen Ratte zeigt 10,98% im Durchschnitt. Diese Menge nimmt entsprechend der Fortsetzung des Hungerns ab.

Versuch 2.

Im ersten Versuche wurde nachgewiesen, dass, wenn man in der heissen Jahreszeit die Ratten hungern lässt, es zur Zunahme der Leberfettmenge kommt. Ich habe nun in derselben Jahreszeit eine andere Gruppe von Ratten im eisgekühlten Zimmer (Zimmertemperatur 3°–6°) wie im ersten Versuch während 3 Wochen aufgezogen, danach hungern lassen, die Fettmenge des Tierkörpers nach Entfernung der Leber und die der Leber selbst bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle III.

TABELLE III.

Tier	Tier-Nr.	Leichenfett (%)	Leberfett (%)
norm.	41	8,80	4,28
	42	6,74	4,04
	43	8,09	3,81
	Mittel	7,87	4,04
Hunger (1. Tag)	44	3,23	2,80
	45	7,14	3,29
	46	6,67	3,17
	47	7,80	3,88
	Mittel	6,21	3,27
Hunger (2. Tag.)	48	4,24	2,41
	49	5,36	3,54
	50	3,28	2,46
	Mittel	4,29	2,80

Hunger (3. Tag.)	51	1,36	1,29
	52	1,61	0,73
	53	1,27	0,50
	54	1,36	1,17
	55	2,39	2,21
	Mittel	1,59	1,17

Nach den Ergebnissen in Tabelle III ist die Fettmenge des abgetöteten Tieres, welchem die Leber entnommen war, gering im Vergleich zu derjenigen des vorigen Versuchs. Auch betrug die Leberfettmenge am 1. Hungertage durchschnittlich 3,27%, sie lässt gegenüber dem normalen Werte keine Zunahme beobachten. Am 2. Hungertage war sie 2,80% und zeigte am 3. Hungertage 1,17%, also eine allmähliche Abnahme.

Aus den obigen Ergebnissen geht hervor, dass sogar in der heissen Jahreszeit, wenn man die Ratte in einer kalten Umgebung aufzieht, die Körperfettmenge geringer als die bei heisser Temperatur ist und es beim Hungern zu keiner Zunahme des Leberfettes kommt.

Versuch 3.

Ich habe dann in der Jahreszeit mit etwas niedrigerer Temperatur, im Oktober (höchste Temp. 21,1°, niedrigste 13,2° durchschnittlich 17,1°) die gleichen Versuche wie im ersten Versuch durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle IV.

TABELLE IV.

Tier	Tier-Nr.	Leichenfett (%)	Leberfett (%)
norm.	56	4,86	3,42
	57	4,81	4,28
	58	4,33	4,17
	Mittel	4,66	3,95
Hunger (1. Tag)	59	4,09	3,70
	90	4,24	8,55
	61	2,24	5,04
	62	2,14	2,99
	Mittel	3,17	5,07

Hunger (2. Tag.)	63	2,08	5,23
	64	3,37	—
	65	2,41	3,50
	66	3,15	2,44
	Mittel	2,75	3,72
Hunger (3. Tag.)	67	2,14	4,22
	68	2,34	3,03
	69	1,77	2,45
	Mittel	2,08	3,23
Hunger (4. Tag.)	70	3,30	3,47
	71	2,38	1,86
	Mittel	2,84	2,66

Nach den Ergebnissen in Tabelle IV ist die Fettmenge des Tierkörpers, dem die Leber entnommen war, gegenüber derjenigen der heissen Jahreszeit gering. Die Leberfettmenge zeigt eine Zunahme, indem sie durchschnittlich 5,07% beträgt; besonders bei der Ratte von Nr. 60 beträgt sie einen grossen Wert 8,55% gegenüber der im allgemeinen kleinen Zunahme bei andern Ratten. Vom 2. Hungertage an nimmt die Leberfettmenge ab.

Hieraus geht hervor, dass in der etwas niedrigeren Lufttemperatur des Herbstes der Grad der Zunahme der Leberfettmenge durch Hungern schwächer ist als in der Sommerszeit.

IV. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

Die obigen Ergebnisse lassen sich folgendermassen zusammenfassen.

1. In der hohen Lufttemperatur des Sommers nimmt die Leberfettmenge am 1. Hungertage auffallend zu, verglichen mit dem normalen Werte, und erreicht das Drei- bis Vierfache. Auch am 2. Hungertage zeigt sich noch die doppelte Zunahme.

2. Auch im Sommer, wenn man das Tier im eisgekühlten Zimmer aufzieht und hungern lässt, beobachtet man keine Zunahme der Leberfettmenge.

3. Das Hungertier im Herbst lässt nur eine schwache Zunahme der Leberfettmenge beobachten gegenüber dem Hungertier in der Sommerszeit.

Die obigen Ergebnisse führen zu folgendem Schluss.

Wenn man in der warmen Jahreszeit das Tier hungern lässt, dann kommt es zur Zunahme der Leberfettmenge, hingegen nicht in der kalten Jahreszeit. Man kann deshalb annehmen, dass das Auseinandergehen der bisherigen Untersuchungsergebnisse darauf beruht, dass die Versuche in verschiedenen Jahreszeiten ausgeführt wurden.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Y. Sueyoshi meinen herzlichen Dank für seine Anleitung aus.

LITERATUR.

- Higuchi (1924): Keio-Igaku (Japanisch), 4, 823.
Koyama (1937): J. Biochem., 25, 141.
Kumagawa-Suto (1908): Biochem. Z., 8, 212.
Monaghan (1932): J. biol. Chem., 98, 21.
Ohta (1940): J. Biochem., 31, 185.
Sinclair (1933): J. biol. Chem., 100, LXXXVII.

